

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**REGULACION DE LA EXPRESION Y
FUNCION DE LA MOLECULA DE ADHESION
CELULAR CADHERINA E DURANTE
LA PROGRESION TUMORAL EN LA
CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATON.**

TESIS DOCTORAL

M^a ISABEL RODRIGO CASTRO

Madrid, 1997

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**REGULACION DE LA EXPRESION Y
FUNCION DE LA MOLECULA DE ADHESION
CELULAR CADHERINA E DURANTE
LA PROGRESION TUMORAL EN LA
CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATON.**

Memoria que presenta, para optar al grado de
Doctor en Farmacia, la licenciada

M^a ISABEL RODRIGO CASTRO

Director de tesis: **Dra. Amparo Cano García**
Profesora Titular de la Universidad Autónoma de Madrid
Dpmto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Madrid, Diciembre de 1997

Esta Tesis ha sido realizada gracias a la concesión a
Isabel Rodrigo Castro de una Beca de Formación de Personal
Investigador por parte de la Comunidad Autónoma de Madrid.

*A mis padres
y a mi hermana*

AGRADECIMIENTOS

Realmente tengo muchas cosas que agradecer, muchas, a mucha gente que me ha ayudado durante estos años, tanto en el trabajo, como personalmente, y la mayoría de las veces las dos cosas.

Por supuesto, a Amparo, mi directora de tesis, por todo lo que me ha enseñado, por su dedicación y por su esfuerzo.

También me gustaría agradecer a la gente del Instituto que me ha ayudado en determinados momentos: a Javier y Beatriz, por echarme un cable con los ordenadores; a Javier, el delineante, por enseñarme a manejar el MacDraw; a Antonio y a Ricardo, los fotógrafos, por estar siempre dispuestos; a Jorge Martín por su ayuda con el Endnote. A Begoña, y a René, que mientras estuvo en el IIB siempre se preocupó por nosotros.

Me gustaría recordar a mi primera "jefa" María de Ceballos, por iniciarme en este mundo. Y volviendo más atrás en el tiempo a Mario, mi profesor de física en Getafe, por traer a unos alumnos de COU a visitar "un" centro de Investigación en Madrid, donde me quedé una temporada.

A Angels Fabra y Ana Llorens por su colaboración en el trabajo de la metástasis. También a Angela Nieto, por su aportación a este trabajo con relación a los genes slug y snail. A Andrew Cato, por aceptarme en su laboratorio para aprender técnicas de transcripción. Y también a Jorge Martínez, por la calurosa acogida que me brindó en su laboratorio en Chile.

Quiero agradecer también a la gente que conocí en Karlsruhe, por su ayuda y compañía, y por hacerme más agradable la estancia allí: Andreas, Jutta, Erik, Michael y a Markus, por sus consejos y su paciencia.

A mis amigas "de toda la vida", Carmen (Rueda) y Teresa, y a mis amigos de la carrera, Carmen "de Móstoles" y Carmen "la rubia", Merche y Alejandro, por estar siempre ahí. También a Cristina, Yolanda, Mari Luz y Teresa, por el cariño con el que me han tratado.

Y, como no, a mis amigos y compañeros del instituto y la facultad, donde he conocido a gente estupenda, de verdad. Por supuesto, una mención muy especial a Marisa, que me enseñó prácticamente a andar en el laboratorio, por toda su entrega desinteresada, por ser tan buena maestra y por ser tan buena amiga.

A Pilar (gracias, Pilar, que habría hecho yo sin tu ayuda estos últimos días locos) y a Cata, gracias por su amistad, y por los buenos y malos ratos compartidos y que compartiremos. A los demás amigos y compañeros del 1.7, Oscar, Maite, Jesús, Damaris, Juan Francisco, Amalia y Miguel; y por supuesto gracias también a los que estuvieron un día por el 1.7 pero andan ahora por otros lugares: Carlos, Encarni, Mónica...

A Juan, por ser tan buen amigo y por ayudarme tanto. También a Vicky y a María por hacerme pasar muy buenos ratos. A Paloma, por ser como es. Y también a Gemma,

Carmela, Belén (vaya cocidos más ricos), Marga, Aurora, Ana, Raúl, Rafa, Jose, Cris, Alberto García y mucha más gente del IIB y la facultad, por compartir cafés, comidas y por su ayuda e interés.

También me gustaría agradecer a mi familia el que se preocupara tanto por "la célula" en estos años de tesis.

Y por último, a quien más ha soportado mis cambios de humor, a quien me ha apoyado incondicionalmente, sin los cuales no habría podido realizar este trabajo: a mis padres y a mi hermana. Gracias por su comprensión, su cariño, su esfuerzo, su ayuda ilimitada, su paciencia y su apoyo.

Me hubiera gustado llegar un poco más lúcida a este momento de escribir esta página. Sin embargo, los que me conocen, saben que mi agradecimiento es sincero, que soy consciente de que sin su ayuda no me habría sido posible realizar esta Tesis, y que este ha sido un trabajo de grupo. Gracias a todos.

ABREVIATURAS

APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCIP	bromocloroindolilfosfato
BCA	ácido bicinconínico
BSA	albúmina de suero bovina
CAT	cloranfenicol acetil transferasa
Ci	curio
CD-E	cadherina E
CD-P	cadherina P
CMV	citomegalovirus
cpm	cuentas por minuto
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMBA	dimetilbenza-antraceno
DMS	dimetilsulfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
fpu	unidad de footprinting
GADPH	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
h	hora
HaMSV	virus del sarcoma murino de Harvey
HBSS	solución salina equilibrada de Hank.
Hepes	ácido 3-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico
Kb	kilo pares de bases
KDa	kilo dalton
MMP	metaloproteínasa de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
NBT	nitro-blue-tetrazolio
pb	pares de bases
PAC	puromicina N-acetil transferasa
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RNA	ácido ribonucleico
RSV	Virus del Sarcoma de Rous
RT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR
SDS	dodecil sulfato sódico
SV40	Virus Simio 40
TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	tampón Tris salino
T-TBS	tampón TBS con Tween-20
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
tPA	activador tisular del plasminógeno
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
U	unidad enzimática (según la definición del proveedor)
uPA	activador del plasminógeno tipo uroquinasa

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1- Procesos de adhesión celular	6
2- Uniones celulares en tejidos epiteliales.....	6
3. La piel y la epidermis	9
4. Las cadherinas	10
4.1. Superfamilia de las cadherinas. Clasificación, características y estructura.....	10
4.2. Complejos cadherinas-cateninas	12
4.3. Importancia biológica de las cadherinas clásicas	13
4.3.1. Papel morforregulador de las cadherinas	13
4.3.2. Papel de las cadherinas en la señalización celular.	15
4.3.3. Papel de las cadherinas en procesos tumorales, invasión y metástasis.	16
5. Invasión y metástasis: papel de proteasas de matriz extracelular	18
6. Regulación de la expresión génica en sistemas epiteliales. El promotor de CD-E.....	21
6.1. Regulación de la expresión de CD-E.....	21
6.2. Caracterización de regiones reguladoras del gen de CD-E.....	23
6.3. Regulación de la expresión epitelio-específica.....	24
7. El modelo de carcinogénesis de piel de ratón.....	27
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
MATERIALES	33
1. Reactivos químicos y bioquímicos.	33
2. Tampones y soluciones	33
3. Medios empleados en cultivo de células.....	33
4. Líneas celulares	34
5. Animales de experimentación	36
6. Anticuerpos y reactivos inmunológicos.....	36
6.1. Anticuerpos primarios	36
6.2. Anticuerpos secundarios.....	36
7. Sondas empleadas en experimentos de Northern-blot	37
8. Plásmidos.....	37
8.1. Plásmidos empleados en la obtención de transfectantes estables.....	37
8.2. Plásmidos empleados en los experimentos de transfección transitoria	38
8.2.1. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-E.....	38
8.2.2. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-P.....	40
8.2.3. Plásmidos control en los experimentos de actividad promotora de CD-E y de CD-P.....	40
8.2.4. Vectores de expresión empleados en los experimentos de cotransfección.....	40

9. Oligonucleótidos.....	41
9.1. Oligonucleótidos empleados en la generación del plásmido m-Ets.....	41
9.2. Oligonucleótidos y fragmentos de DNA empleados en experimentos de retardo en gel.....	41
9.3. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de footprinting <i>in vivo</i>	43
MÉTODOS.....	44
1. Cultivo celular	44
2. Obtención de transfectantes estables.....	44
3. Métodos inmunológicos.....	44
3.1. Inmunofluorescencia.....	44
3.2. Obtención de extractos celulares para inmunoblot.....	45
3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunoblot	45
4. Ensayos de migración <i>in vitro</i> en geles de colágeno	46
5. Ensayos del comportamiento <i>in vivo</i> de los clones transfectantes.....	46
5.1. Ensayos de tumorigenicidad.....	46
5.2. Ensayos de metástasis espontánea	47
6. Detección de proteasas por zimografía	47
6.1. Detección de la actividad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).....	47
6.2. Detección de actividad gelatinolítica.....	47
7. Análisis de RNA por transferencia a membrana (Northern-blot).....	48
7.1. Obtención de RNA.....	48
7.2. Purificación y marcaje de sondas.....	48
7.3. Ensayo de Northern-blot.....	48
8. Ensayos de expresión transitoria.....	49
8.1. Transfección transitoria.....	49
8.2. Preparación de extractos celulares.....	49
8.3. Ensayos CAT	49
8.4. Medida de actividad luciferasa	50
8.5. Medida de actividad β -galactosidasa.....	50
9. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética en gel.....	50
9.1. Obtención de extractos nucleares.....	50
9.2. Ensayos de retardo en gel.....	50
9.3. Ensayos de competición.....	51
9.4. Ensayos de super-retardo.....	51
10. Experimentos de protección a DNAasaI o de footprinting <i>in vitro</i>	51
10.1. Proteínas purificadas y extractos nucleares.....	51
10.2. Obtención y marcaje de la sonda.....	51
10.3. Secuenciación química por Maxam-Gilbert.....	52
10.4. Digestión con DNAasaI y separación de los fragmentos en gel.....	52
11. Análisis del estado de metilación endógena del DNA.....	52

11.1 Obtención de DNA genómico.....	52
11.2. Purificación y marcaje de la sonda	52
11.3. Digestión del DNA y ensayo de Southern-blot.....	52
12. Experimentos de footprinting <i>in vivo</i>	53
12.1. Metilación y obtención del DNA.....	53
12.2. Digestión con piperidina.....	53
12.3. Amplificación por PCR mediada por adaptador.....	53
12.4. Separación en gel y visualización.....	55
RESULTADOS.....	56
1. Papel de la cadherina-E en el comportamiento maligno de queratinocitos tumorales del ratón.....	57
1.1. Generación de transfectantes de la línea celular E24 con un vector de CD-E antisentido.....	58
1.2. Caracterización inicial de los transfectantes	62
1.3. Ensayos de migración <i>in vitro</i>	62
1.4. Comportamiento <i>in vivo</i> de los transfectantes	65
1.5. Niveles de Ha-ras.....	67
1.6. Papel de proteasas de matriz extracelular.....	68
1.6.1. Activador del plasminógeno tipo urokinasa	68
1.6.2. Metaloproteinasas de matriz	68
1.7. Estudio de la relación entre CD-E y MMP-9	71
2. Regulación de la expresión de CD-E en la carcinogénesis de piel de ratón.....	74
2.1. Actividad del promotor de CD-E en queratinocitos de ratón.....	74
2.2. Unión de factores nucleares al promotor de CD-E.....	81
2.2.1. Interacción de factores nucleares con la región 5' proximal.....	81
2.2.2. Análisis de los factores que interaccionan con el elemento E-pal.....	84
2.2.3. Análisis de los factores que interaccionan con la caja CCAAT.....	87
2.2.4. Análisis de los factores que interaccionan con la región rica en GC	89
2.2.5. Análisis de los factores que interaccionan con la región ECE	94
2.3. Análisis funcional de la región ECE y del elemento Ets en la actividad promotora de CD-E.....	97
2.4. Estudios del promotor endógeno de CD-E.....	102
2.4.1. Estado de metilación endógena del promotor de CD-E.....	102
2.4.2. Estudios de footprinting <i>in vivo</i>	104
2.5. Estudio comparativo de los promotores de CD-E y CD-P de ratón.....	108
DISCUSIÓN.....	117
1. Implicación de la CD-E en la metástasis. Relación con la MMP-9.....	118
1.1. CD-E y propiedades tumorales: Papel en la metástasis	118
1.2. Mecanismos implicados en la mayor capacidad metastásica e invasiva por la pérdida de CD-E: Papel de MMP9.....	120
2. Mecanismos que controlan la expresión de CD-E en la carcinogénesis de piel de ratón.	122
2.1. Región -178/+92. Elementos reguladores	123

2.1.1. Elemento represor E-pal	124
2.1.2. La región GC y la caja CCAAT regulan positivamente la transcripción	126
2.1.3. Papel regulador negativo del sitio Ets.....	128
2.2. Promotor endógeno de CD-E. Mecanismos reguladores de su transcripción en queratinocitos de ratón	130
2.3. Mecanismos de regulación comunes y diferenciales de los promotores de CD-E y CD-P	131
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFIA.....	136
ANEXO	159

RESUMEN

Durante la progresión tumoral, y en concreto en la carcinogénesis de piel de ratón, la desaparición de la molécula de adhesión celular cadherina E (CD-E) se ha relacionado con una mayor capacidad invasiva. Para estudiar más a fondo el papel de esta molécula, así como la regulación de su expresión, hemos analizado en este estudio diferentes líneas celulares representativas de distintos estadios de la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón. La transfección de un cDNA antisentido de CD-E en la línea celular E24, tumorigénica pero no metastásica, bloqueó la expresión de CD-E sin afectar a otras moléculas relacionadas. Los transfectantes anti-sentido aumentaron su capacidad invasiva en geles de colágeno y, de forma interesante, adquirieron capacidad metastásica tras su inyección intradérmica en ratones inmunodeprimidos. El análisis de la actividad de varias proteasas de matriz extracelular mostró que las células que habían perdido la CD-E presentaban una actividad gelatinolítica MMP-9 muy elevada. Esta relación inversa entre CD-E y actividad MMP-9 se puso de manifiesto en otros sistemas celulares dentro del modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, sugiriendo que puede ser un mecanismo general, por el que la CD-E controla el comportamiento invasivo y metastásico.

Por otra parte, para estudiar la regulación de la expresión de la CD-E en la carcinogénesis, hemos analizado la actividad transcripcional de la región 5' del gen de CD-E en diferentes líneas celulares representativas de los distintos estadios de la progresión y con niveles variables de CD-E. Una región comprendida entre las posiciones -178/+92 respecto del inicio de la transcripción mostró actividad específica, siendo activa en líneas celulares CD-E positivas y prácticamente inactiva en líneas que no expresaban CD-E. Un análisis detallado de esta región, mediante estudios de footprinting *in vivo* e *in vitro*, análisis de retardo en gel y ensayos de transfección transitoria con distintas construcciones del promotor de CD-E silvestre y mutado, permitió definir diversos elementos reguladores de la transcripción de CD-E. Así, una región rica en GC, situada en posición -58 a -32, con capacidad de unir los factores de transcripción SP1 y AP2 y una caja CCAAT, en posición -65, controlan positivamente la transcripción; mientras que un elemento palindrómico E-pal, situado de -86 a -75, lo hace negativamente. Adicionalmente, se ha identificado una región de unión a factores Ets, en posición -95, que controla de forma negativa la transcripción en células que expresan CD-E, posiblemente por interacción con otros factores de transcripción. Los resultados obtenidos sugieren también que el bloqueo de la transcripción en las células CD-E negativas se realiza principalmente por el fuerte efecto represor que ejerce el elemento E-pal. Por otra parte, la comparación de las regiones promotoras de los genes de CD-E y cadherina P, la otra cadherina clásica expresada en queratinocitos de piel, mostró que existen mecanismos reguladores comunes que actúan a través de la caja CCAAT y de la región rica en GC, así como mecanismos adicionales en la regulación de la expresión del gen de CD-E. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de mecanismos complejos de regulación de la expresión de CD-E, alterados durante la progresión tumoral.

ABSTRACT

During tumor progression, specifically in mouse skin carcinogenesis, the disappearance of the cell adhesion molecule E cadherin (E-CD) has been correlated with an increase in the invasive capacity. To further understand the role of this molecule, as well as the regulation of its expression, we have analysed in the present study several cell lines representative of different stages of tumor progression in mouse skin carcinogenesis. Transfection of an E-CD antisense cDNA in the tumorigenic but non metastatic E24 cell line, blocked E-CD expression without affecting other related molecules. The anti-sense transfectants showed an increase in invasiveness through collagen gels and, interestingly, they became metastatic after intradermal injection in immunosuppressed mice. The analysis of the activity of several extracellular matrix proteinases showed that cells that had lost E-CD had an increase in MMP-9 gelatinase activity. This inverse correlation between E-CD and MMP-9 activity was also evident in other cell systems belonging to the mouse skin carcinogenesis model, suggesting that it may be a general mechanism by which E-CD controls the invasive and metastatic behaviour.

On the other hand, to study the regulation of expression of E-CD in carcinogenesis, we have analysed the transcriptional activity of the 5' region of the mouse E-CD gene in a collection of cell lines representative of different stages of tumor progression and with variable levels of E-CD. An area comprised between -178/+92 positions, regarding the transcription start site, showed specific activity being active in positive E-CD cell lines and almost inactive in non expressing E-CD cell lines. A detailed analysis on this area, using *in vivo* and *in vitro* footprinting studies, gel shift analysis and transient transfection assays with different constructs of wild type and mutated E-CD promoter, allowed us to define several E-CD transcription regulatory elements. Thus, a GC-rich region, located at -58 to -32 position, with binding capacity for SP1 and AP2 transcription factors and a CCAAT box, at -65 position, are positive control elements of transcription; while a palindromic element, E-pal, located at -86 to -75, is a negative control element. In addition, an Ets-binding sequence, at -95 position, acts as a negative control element of transcription in E-CD expressing cell lines, possibly by interacting with other transcription factors. The results obtained so far let us also to suggest that the lack of expression in E-CD negative cell lines is mainly performed by the strong repressor effect of the E-pal element in those cells. On the other hand, comparison between promoter regions of the E- and P-cadherin murine genes (the two classical cadherins expressed in skin keratinocytes) showed that there are common regulatory mechanisms that act through the CCAAT-box and the GC-rich region, as well as additional mechanisms in E-CD gene regulation. Taken together, these results suggest the existence of complex mechanisms of regulation of E-CD expression, impaired during tumor progression.

INTRODUCCIÓN

1- PROCESOS DE ADHESIÓN CELULAR.

Los organismos multicelulares están compuestos de tipos celulares heterogéneos que organizan distintos patrones durante el desarrollo para formar tejidos y órganos. Entre los procesos más importantes implicados en regular el establecimiento y mantenimiento de esta estructura tisular están los procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, y la existencia de procesos de adhesión selectiva.

Los receptores de membrana implicados en estos procesos se denominan en su conjunto CAMs (del inglés Cell Adhesion Molecules, moléculas de adhesión celular) y estructuralmente son glicoproteínas transmembrana. Existen dos tipos de CAMs funcionalmente diferentes: dependientes de calcio (cadherinas) e independientes de calcio (inmunoglobulinas, integrinas, selectinas y sindecanos). Son las moléculas de adhesión dependientes de calcio, las cadherinas, las que parecen tener un papel fundamental en la adhesión celular específica de tejido que ocurre durante el desarrollo embrionario en vertebrados, esencial para la correcta formación del organismo adulto. Las cadherinas desempeñan además un papel primordial en el mantenimiento de la estructura del organismo adulto, y se encuentran prácticamente en todos los tipos celulares de vertebrados (Takeichi, 1991).

Durante el desarrollo de esta Tesis se ha estudiado el papel y regulación de las cadherinas en un tipo tisular concreto: la epidermis, un epitelio compuesto estratificado, donde se expresan varios miembros de esta familia de moléculas. En la epidermis, las cadherinas se localizan principalmente en uniones celulares estructuradas localizadas en la membrana plasmática. Por tanto, a continuación vamos a describir los tipos de uniones celulares que existen en los tejidos epiteliales, así como la estructura de la epidermis de un organismo adulto, para pasar posteriormente al estudio más detallado de la familia de las cadherinas.

2- UNIONES CELULARES EN TEJIDOS EPITELIALES.

Los tejidos epiteliales se caracterizan por una fuerte asociación de las células individuales que lo componen, formando láminas (los epitelios). A su vez, estas células se unen a la matriz extracelular subyacente, la lámina basal. En el mantenimiento de la estructura de este tejido, que tiene que soportar un fuerte estrés mecánico, juegan un papel fundamental las uniones celulares (célula-célula o célula-matriz), estructuras especializadas de la membrana plasmática formadas entre membranas de células adyacentes o con la lámina basal.

En los epitelios existen tres tipos de uniones celulares, que aparecen representadas en la figura 1: uniones estrechas, uniones de anclaje y canales de comunicación o "gap junctions" (Alberts *et al.*, 1994). En las uniones de anclaje puede intervenir el citoesqueleto de actina, en las uniones adherentes (célula-célula) y en los contactos focales (célula-matriz), o el citoesqueleto de filamentos intermedios, en los desmosomas (célula-célula) y hemidesmosomas (célula-matriz).

Mientras que las uniones estrechas y las gap junctions tienen papeles fisiológicos determinados en el control de la permeabilidad transepitelial y la comunicación intercelular, el resto de uniones celulares desempeñan un papel fundamental en los procesos de adhesión celular. En concreto, moléculas de la familia de las cadherinas participan en la formación de las uniones adherentes y de los desmosomas. Las cadherinas, que son proteínas transmembrana, se asocian con proteínas del citoesqueleto a través de un conjunto de proteínas citoplásmicas de anclaje, formando una "placa" citoplásmica al interior de la membrana plasmática (Cowin y Burke, 1996).

Las uniones adherentes contienen cadherinas (como la cadherina-E, también llamada uvomorulina, en células epiteliales) que interaccionan en su dominio intracelular con unas moléculas citoplásmicas llamadas cateninas: α , β y γ catenina, esta última denominada también plakoglobina (Kemler, 1993). En algunos casos se ha encontrado una catenina adicional, la fosfoproteína p120 (Reynolds *et al.*, 1994). Las cateninas se anclan al citoesqueleto de actina, que forma un anillo alrededor de las células. Existen otras proteínas intracelulares que también participan en la formación de estos complejos como vinculina, α -actinina, ezrina, radixina y moesina (Tsukita *et al.*, 1992).

Los desmosomas, de forma análoga, conectan de modo puntual el citoesqueleto de filamentos intermedios (constituído por citoqueratinas) de células adyacentes. Las proteínas transmembrana son desmogleínas y desmocolinas (pertenecientes a la familia de las cadherinas), que interaccionan con las proteínas puente intracelulares desmoplaquina y plakoglobina (Garrod, 1993).

En células migratorias embrionarias no se ha observado una estructuración en uniones de anclaje, a pesar de ocurrir procesos de adhesión celular selectiva. Se ha sugerido que estos procesos de adhesión celular sin uniones celulares inician los procesos adhesivos selectivos, que son posteriormente orientados y estabilizados por la formación de uniones celulares estructuradas. Así, se cree que la formación de uniones intercelulares en los epitelios es necesaria para lograr la fuerza mecánica y para la polarización y orientación de las células (Gumbiner, 1996). En cualquier caso, la formación de uniones celulares debe ser un proceso flexible y altamente regulado, para permitir fenómenos como, por ejemplo, la regeneración de ciertos epitelios, donde debe existir migración celular sin pérdida de la integridad tisular.

CÉLULAS EPITELIALES

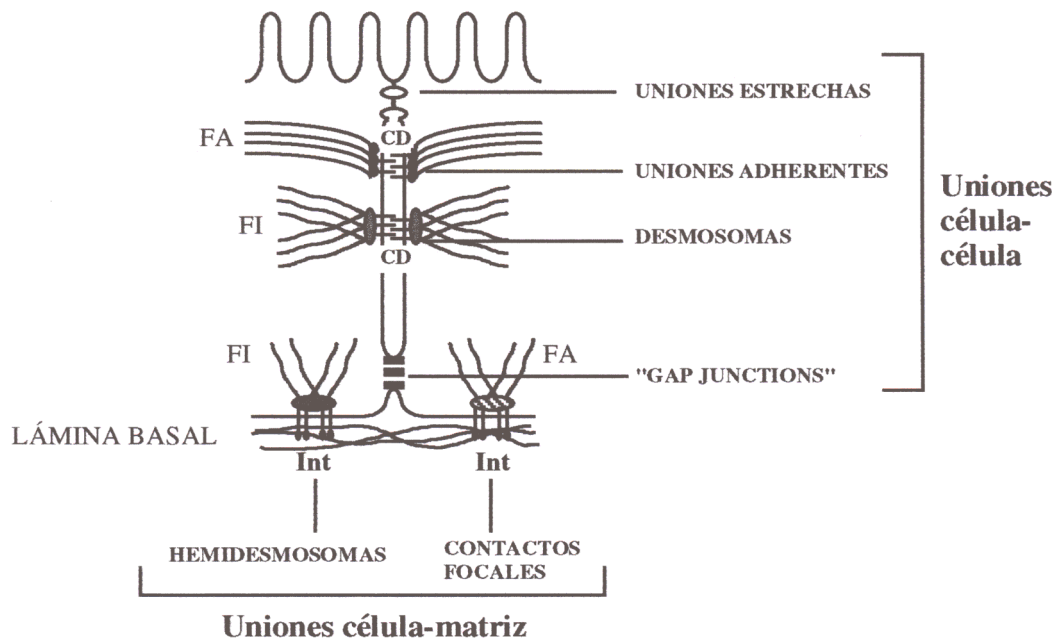


Fig. 1. Esquema de los tipos de uniones que existen en las células epiteliales.

FA, filamentos de actina; FI, filamentos intermedios; CD, cadherinas; Int, integrinas.

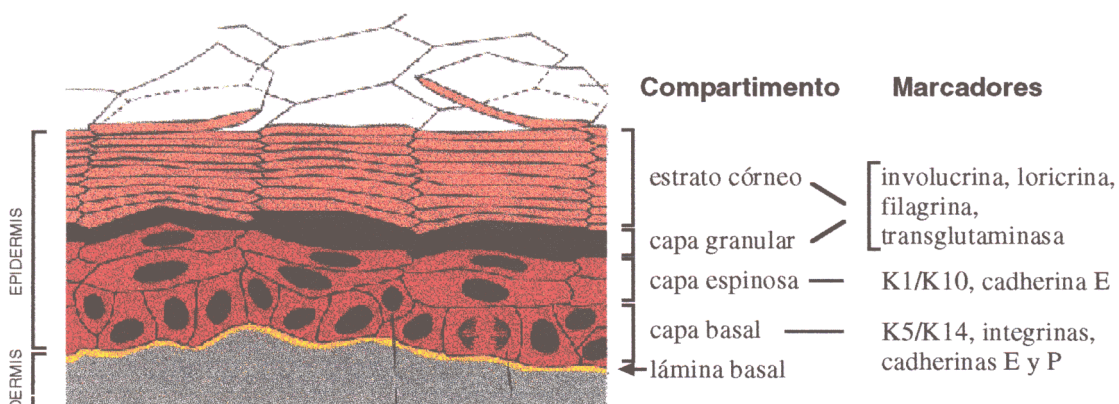


Fig. 2. Estructura de la piel y de los marcadores de diferenciación presentes en cada capa de la epidermis. K, queratina. Adaptado de Alberts *et al.*, 1994.

3. LA PIEL Y LA EPIDERMIS.

La piel está constituida por dos tipos de tejidos: uno epitelial, cuyas células tienen origen ectodérmico, la epidermis, y un tejido conjuntivo subyacente, de células mesodérmicas denominado dermis, separados por una fina lámina basal (Fig. 2). La lámina basal está compuesta mayoritariamente por colágeno tipo IV, laminina, nidogen/entactina y proteoglicanos (Yurchenco y O'Rear 1994).

La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado compuesto principalmente por células epiteliales denominadas queratinocitos, aunque también están presentes, en pequeño número, otros tipos celulares como melanocitos, células de Langerhans (tipo macrófagos) y células de Merkel (asociadas a terminaciones nerviosas). Los queratinocitos se organizan en distintas capas dentro de la epidermis: capa basal, espinosa, granulosa y córnea (Fig. 2). Las células de la capa basal son las que están en contacto con la lámina basal, y las únicas células con capacidad de proliferar, entre las que se encuentran las células primordiales o células "stem". Por repetidas divisiones de estas células stem se originan células hijas que diferencian y migran hacia la superficie de la piel, hasta su desprendimiento, sufriendo cambios morfológicos y bioquímicos que en su conjunto reciben el nombre de diferenciación terminal (Fuchs, 1990; Fuchs y Byrne, 1994). Entre los cambios bioquímicos que sufren los queratinocitos durante la diferenciación terminal se encuentran cambios en la expresión de receptores de adhesión, como las cadherinas e integrinas y de proteínas estructurales como las citoqueratinas.

Las células de la capa basal expresan receptores de adhesión como la cadherina E (CD-E) y la cadherina P (CD-P) (Nose y Takeichi, 1986; Shimoyama *et al.*, 1989), integrinas de la subfamilia β_1 ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$) y $\alpha_6\beta_4$ (Tennenbaum *et al.*, 1992; Watt y Hertle, 1994) y queratinas K5 y K14 (Leube *et al.*, 1988). A medida que la célula va diferenciando se pierde la expresión de integrinas y de CD-P (restringidas sólo a la capa basal), manteniéndose la expresión de CD-E en los estratos espinoso y granular (Hirai *et al.*, 1989b; Adams y Watt, 1990, 1991). Asimismo, se producen cambios en la expresión de citoqueratinas, de manera que las células del estrato espinoso pierden la expresión de K5 y K14 y expresan K1 y K10 (Fuchs, 1990; Fuchs y Byrne, 1994). En las capas exteriores del estrato granuloso, y en el estrato córneo, se expresan involucrina, loricrina y filagrina, proteínas citoplásmicas que refuerzan la membrana plasmática y que se han empleado como marcadores de diferenciación terminal (Nicholson *et al.*, 1991; Bickenbach *et al.*, 1995). Los cambios morfológicos que sufren los queratinocitos son el aplanamiento de las células, la pérdida del núcleo y la formación de una estructura córnea que invade el citoplasma, cambios que ocurren en las últimas etapas del proceso de diferenciación. Así, las células de la capa córnea son células muertas reducidas a escamas rellenas de queratina.

Entre las uniones celulares que mantienen la morfología y las propiedades de elasticidad y resitencia de la epidermis, los hemidesmosomas se encuentran exclusivamente

en células de la capa basal, manteniendo contacto con la lámina basal, mientras que las uniones adherentes y los desmosomas se encuentran en todas las capas de la epidermis, aunque éstos últimos se localizan mayoritariamente en la capa espinosa (Garrod, 1993; Cowin y Burke, 1996).

4. LAS CADHERINAS.

4.1. Superfamilia de las cadherinas. Clasificación, características y estructura.

Las cadherinas constituyen una superfamilia de glicoproteínas transmembrana que en general median adhesión celular homotípica (por interacción con otra cadherina de igual tipo) dependiente de calcio, tanto en organismos vertebrados como invertebrados y en todos los tejidos sólidos del organismo (Takeichi, 1991, 1995). La primera cadherina fue identificada en 1977 en ratón (Kemler *et al.*, 1977) y se denominó uvomorulina. En los años 80 se descubrieron muchas otras en diversas especies con anticuerpos que bloqueaban la adhesión celular en ensayos de agregación dependientes de calcio y que pertenecían al grupo que se ha denominado de cadherinas clásicas (Bertolotti *et al.*, 1980; Yoshida y Takeichi, 1982; Hatta *et al.*, 1985; Nose y Takeichi, 1986; Nose *et al.*, 1987). En los últimos años se han identificado, por homología estructural y mediante técnicas de biología molecular, numerosos nuevos miembros de la familia, para algunos de los cuales aún no se ha demostrado una función en adhesión celular, pudiendo incluso tener otras funciones biológicas (Hoffmann y Balling, 1995; Thomson *et al.*, 1995; Tashiro *et al.*, 1995; Franklin y Sargent, 1996; Lee, 1996; Sugimoto *et al.*, 1996).

Todas las cadherinas identificadas hasta la fecha, con la excepción de la cadherina T (anclada a la membrana por fosfatidilinositol, Vestal y Ranscht, 1992) son proteínas integrales de membrana tipo I organizadas en una región extracelular, una región hidrofóbica que atraviesa la membrana una única vez y un dominio citoplásmico. La región extracelular contiene dominios repetidos denominados EC, cada uno de los cuales contiene 1-2 sitios de unión a calcio. En general la porción intracelular se ancla con el citoesqueleto a través de proteínas citoplásmicas (cateninas) (Gumbiner, 1996).

Las cadherinas se han clasificado, según características funcionales y homología de secuencia, en tres grandes subfamilias: protocadherinas, cadherinas desmosomales y cadherinas clásicas (Marrs y Nelson, 1996; Suzuki, 1996). Además, el proto-oncogen c-ret, codifica para una molécula tipo cadherina, pero con función tirosina quinasa en su dominio citoplásmico (Scheider, 1992; Iwamoto *et al.*, 1993).

Las protocadherinas o cadherinas tipo *fat* son una familia heterogénea de moléculas identificadas en *Drosophila* por primera vez como moléculas que controlaban negativamente el crecimiento del epitelio de los discos imaginales, por lo que se les ha otorgado un papel como genes supresores de tumores (Mahoney *et al.*, 1991; Sano *et al.*, 1993; Suzuki, 1996).

Contienen dominios EC en su porción extracelular, mientras que la porción citoplásmica carece de homología con los otros tipos de cadherinas y no se ha encontrado hasta la fecha interacción con proteínas citoplásmicas.

Las desmogleínas y desmocollinas, con secuencias de homología con las cadherinas clásicas en la región extracelular, constituyen la subfamilia de cadherinas desmosomales, y se encuentran localizadas en los desmosomas (Koch *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1991; Buxton *et al.*, 1993). Cada una de ellas presenta diferentes isoformas con especificidad tisular y un patrón de expresión específico dentro de las distintas capas de la epidermis (Arneemann *et al.*, 1993; Legan *et al.*, 1994). Las cadherinas desmosomales forman interacciones por su porción extracelular (Chitaev y Troyanovsky, 1997), mientras que por su dominio citoplásmico interaccionan con la plakoglobina, al igual que las cadherinas clásicas (Troyanovsky *et al.*, 1994; Kowalczyk *et al.*, 1994).

Las cadherinas clásicas comprenden una gran familia de genes (Kemler 1992), de los que actualmente se conocen más de 40 miembros entre los que se encuentran los primeros miembros de la superfamilia identificados, cadherinas E, P y N (Kemler *et al.*, 1977; Takeichi 1977; Hyafil *et al.*, 1981; Hatta *et al.*, 1985; Peyrieras *et al.*, 1985; Nose y Takeichi, 1986; Schuh *et al.*, 1986; Shirayoshi *et al.*, 1986a; Nose *et al.*, 1987; Ringwald *et al.*, 1987). Presentan entre sí una alta homología: el dominio extracelular muestra un 30-60% de homología de secuencia entre las diferentes cadherinas, mientras que la homología del dominio citoplásmico puede alcanzar el 90% dentro de la misma especie y hasta un 60% entre cadherinas de mamíferos y *Drosophila* (Takeichi, 1988; Kemler, 1992; Oda *et al.*, 1994a). Las cadherinas clásicas regulan la adhesión célula-célula dependiente de calcio en las uniones adherentes y también en lugares donde no existe una organización ultraestructural (Boller *et al.*, 1985).

Se sintetizan inicialmente como precursores largos que se procesan a formas maduras de 120-130 KDa. El dominio extracelular de las cadherinas clásicas posee cinco dominios EC, en los que aparecen motivos repetidos formados por 3-5 aminoácidos (Fig. 3). En general, en el dominio EC1 aparece la secuencia aminoacídica HAV que determina la especificidad de unión homotípica (Blaschuk *et al.*, 1990; Nose *et al.*, 1990). En las zonas limítrofes entre los dominios EC se han descrito varios dominios de interacción con calcio (Ringwald *et al.*, 1987; Kemler *et al.*, 1989; Ozawa *et al.*, 1990). La región extracelular sufre N-glicosilación en varios sitios, en posición y número variable entre las distintas cadherinas, pero, al menos en la CD-E, estas modificaciones no parecen ser indispensables para su funcionalidad (Shirayoshi *et al.*, 1986b). Cerca del dominio transmembrana hay 4 cisteínas, en posiciones muy conservadas entre las distintas cadherinas.

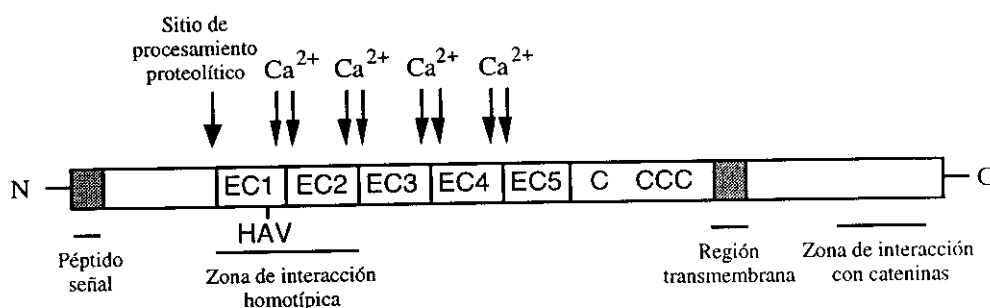


Fig. 3. Estructura consenso de las cadherinas clásicas. Por procesamiento proteolítico del propéptido se origina la proteína madura compuesta de un dominio transmembrana delimitado por una región extracelular y otra intracelular. La región extracelular comprende 5 regiones repetidas con zonas de unión a calcio y 4 cisteínas muy conservadas. La región HAV, en el dominio EC1, interviene en la interacción homotípica entre cadherinas. La zona intracelular, altamente conservada, presenta una zona de 31 aminoácidos de unión a cateninas.

Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional del dominio EC1 de las cadherinas clásicas E y N por resonancia magnética nuclear (Overduin *et al.*, 1995) y por cristalografía de rayos X (Shapiro *et al.*, 1995), respectivamente. A pesar de existir ciertas discrepancias entre ambos estudios, se apunta a una organización en dímeros de las moléculas de cadherinas. Estudios más recientes de estructura cristalina muestran que tres iones calcio se incorporan a la molécula de cadherina entre los dominios EC1 y EC2 obligando a la molécula a adquirir cierta estructura tridimensional rígida (Nagar *et al.*, 1996). En conjunto, se cree que la región extracelular forma dímeros sencillos que al unirse con otro dímero en la membrana de la célula adyacente forma dímeros de adhesión, que podrían asociarse en forma lineal, como una cremallera que une dos membranas de células adyacentes, o bien como oligómeros en forma de cilindros (Pokutta *et al.*, 1994).

4.2. Complejos cadherinas-cateninas.

El dominio intracelular de las cadherinas clásicas, a las que nos referiremos de ahora en adelante, es indispensable para su función adhesiva (Nagafuchi y Takeichi, 1988; Kintner, 1992) y se ancla con el citoesqueleto de actina a través de proteínas intracelulares llamadas cateninas, entre las que se encuentran α -catenina, β -catenina y γ -catenina (plakoglobina) (Ozawa *et al.*, 1989; Kemler, 1993; Aberle *et al.*, 1996). Además, la proteína p120, que es un sustrato de la tirosina quinasa src, se une al complejo de las cadherinas y se ha sugerido que puede representar otra catenina (Reynolds *et al.*, 1994).

La α -catenina presenta homología de secuencia con la vinculina e interacciona directa o indirectamente a través de α -actinina con el citoesqueleto de actina (Rimm *et al.*, 1995; Knudsen *et al.*, 1995). Se han descrito al menos dos isoformas de α -catenina: α E-catenina, específica de epitelios y α N-catenina, de tejido nervioso (Herrenknecht *et al.*, 1991; Nagafuchi *et al.*, 1991; Hirano *et al.*, 1992).

La β -catenina y la plakoglobina pertenecen a la familia de proteínas tipo armadillo, por tener secuencias repetidas (secuencias arm) homólogas a las que existen en el gen de polaridad segmental *armadillo* de *Drosophila* (Butz *et al.*, 1992; Peifer *et al.*, 1992).

Las cadherinas interaccionan, de forma independiente, con β -catenina o con plakoglobina, y éstas a su vez, interaccionan con la α -catenina, que se une al citoesqueleto de actina, por lo que existen al menos dos tipos de complejos cadherinas/cateninas (Butz y Kemler, 1994; Hinck *et al.*, 1994).

Recientemente se ha demostrado que las cateninas también interaccionan con otras proteínas citoplásmicas o transmembrana. Así, tanto plakoglobina como β -catenina interaccionan con la tirosina quinasa c-erbB2 (Kanai *et al.*, 1995) y con la proteína supresora de tumores "Adenomatous Polyposis Coli" (APC) (Su *et al.*, 1993; Rubinfeld *et al.*, 1993). La interacción de β -catenina o plakoglobina con APC es excluyente de su interacción con la cadherina, de forma que APC compite con la cadherina por su unión a las cateninas (Hülsken *et al.*, 1994). Además se ha descrito que la β -catenina se asocia con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (Hoschuetzky *et al.*, 1994) y con la proteína de uniones estrechas ZO-1 (Rajasekaran *et al.*, 1996).

4.3. Importancia biológica de las cadherinas clásicas.

4.3.1. Papel morforregulador de las cadherinas.

Las cadherinas clásicas, además de regular el reconocimiento físico y la adhesión entre células, realizan funciones especializadas que les permiten actuar como moléculas morforreguladoras durante la embriogénesis y la diferenciación, haciendo de ellas moléculas indispensables en el mantenimiento de la arquitectura tisular y de la homeostasis del organismo adulto (Takeichi, 1991; Cunningham, 1995; Takeichi, 1995; Gumbiner, 1996; Marrs y Nelson, 1996).

La participación de las cadherinas en la morfogénesis se planteó inicialmente por la existencia de procesos de adhesión selectiva: fibroblastos transfectados con distintas cadherinas tendían a adherirse con células que expresaban igual tipo de cadherina (Nose *et al.*, 1988); y se comprobó mediante el uso de anticuerpos bloqueantes de su función y el análisis de los efectos en desarrollo o en cultivo de órganos (Takeichi, 1988; Hirai *et al.*, 1989a y 1989b). Recientemente se ha mostrado, mediante el empleo de células embrionarias stem, que cadherinas específicas pueden estimular la formación de tejidos específicos (CD-E epitelio y CD-N cartílago y neuroepitelio), lo que apoya la idea de la participación de las cadherinas en la histogénesis (Larue *et al.*, 1996).

La función de las cadherinas en el mantenimiento de la estructura tisular y la homeostasis es particularmente evidente en el caso de los tejidos epiteliales. Las células epiteliales presentan un alto grado de polarización, y la CD-E es la principal molécula que

controla la polaridad de las mismas, pudiendo inducir la redistribución de la Na^+, K^+ -ATPasa en las regiones de contacto célula-célula, mediada por la reorganización del citoesqueleto (McNeill *et al.*, 1990; Marrs *et al.*, 1995). Así, el bloqueo de la función de CD-E *in vitro* con anticuerpos específicos induce la pérdida de la polaridad celular y de la formación de uniones epiteliales (Imhof, *et al.*, 1983; Behrens *et al.*, 1985; Gumbiner, 1990). Por otro lado, la expresión de cadherinas en fibroblastos, origina una transformación hacia un fenotipo epitelioide, con crecimiento de las células en colonias en vez de en células aisladas y reorganización del citoesqueleto de actina (Edelman *et al.*, 1987; Nagafuchi *et al.*, 1987).

Asimismo, la CD-E es necesaria para el control de la diferenciación de los queratinocitos y para la organización correcta de las distintas capas celulares de la epidermis, como ponen de manifiesto experimentos en los que se altera la diferenciación de queratinocitos o piel en cultivo por el uso de anticuerpos bloqueantes o dominantes negativos anti-cadherinas (Hirai *et al.*, 1989b; Wheelock y Jensen, 1992; Hodivala y Watt, 1994; Amagai *et al.*, 1995; Zhu y Watt, 1996).

Por otro lado, el papel de las cadherinas en tejidos adultos se ha podido comprobar también mediante el empleo de ratones transgénicos, en los que se dirige la expresión de cadherinas o dominantes negativos de cadherinas a ciertos tejidos (Dahl *et al.*, 1996; Hermiston y Gordon, 1995a, 1995b; Hermiston *et al.*, 1996). Así, la sobreexpresión de CD-E en enterocitos, induce un descenso en el movimiento y proliferación celular, así como la inducción de apoptosis (Hermiston *et al.*, 1996). Estos experimentos sugieren la existencia de un nexo entre los procesos de adhesión celular, señalización y apoptosis.

Las cadherinas, además de tener un papel morforregulador en el organismo adulto, desempeñan un papel morfogenético fundamental durante el desarrollo embrionario. La expresión de distintas cadherinas en poblaciones de células separadas, gracias a sus propiedades de adhesión selectiva, hace que las células discriminen entre sí y que segreguen en distintas capas durante el desarrollo (Takeichi, 1988; Takeichi, 1991; Huber *et al.*, 1996a; Takeichi, 1995; Marrs y Nelson, 1996).

Las cadherinas tienen un patrón de expresión definido durante el desarrollo embrionario, que apoya la idea de su papel como moléculas morforreguladoras. En concreto, la expresión de CD-E (primero materna y después embrionaria) se observa en todos los estadios del embrión de ratón. En un principio, la CD-E aparece dispersa por la superficie del oocito. En el estadio de 8-16 células, cuando se produce la compactación y polarización celular de los blastómeros, la CD-E se distribuye y localiza en los contactos celulares (Hyafil *et al.*, 1980). Posteriormente, durante el desarrollo, la CD-E se localiza principalmente en células epiteliales, de origen ecto o endodérmico. El primer tipo celular que es negativo para CD-E es el mesodermo, que se forma en el estadio de la gastrulación. Los derivados mesodérmicos permanecen negativos para CD-E, pero ésta se reexpresa en células que sufren procesos de transición mesénquima-epitelio (Takeichi, 1988). La CD-E también se

expresa en el cerebro embrionario de ratón, en un conjunto de neuronas sensoriales y en las uniones adherentes autotípicas de las células de Schwann (Shimamura y Takeichi, 1992; Fannon *et al.*, 1995; Redies y Takeichi, 1996).

Experimentos de microinyección en *Xenopus* de mRNAs de formas truncadas de cadherinas que actúan como dominantes negativos, y que perturban la integridad de las estructuras embrionarias confirman el papel de las cadherinas en la morfogénesis (Fujimori *et al.*, 1990; Kintner, 1992; revisado en Huber *et al.*, 1996a).

Asimismo, recientemente se han realizado experimentos de pérdida de función de cadherinas, con ratones "knock-out" y con mutantes en *Drosophila*.

Los ratones en los que se ha eliminado el gen de la CD-E mediante técnicas de knock-out son letales embrionarios (Larue *et al.*, 1994; Riethmacher *et al.*, 1995). Los embriones se desarrollan normalmente hasta el estadio de 8 células, siendo capaces de compactarse en el estadio de mórula, probablemente por la existencia de CD-E materna, pero posteriormente el embrión es incapaz de implantarse y de formar el blastocisto (primera monocapa epitelial del embrión) correctamente.

En *Drosophila*, la cadherina-DE (gen *shotgun*) es la homóloga en vertebrados de la CD-E. Mutantes nulos de la cadherina-DE no muestran en general defectos severos en la organización epitelial, debido a la existencia de cadherina materna. Sin embargo, sí se ve alterada la formación de epitelios que requiere grandes remodelaciones morfogenéticas (como los túbulos de Malpigio o los conductos de la tráquea). La ausencia total de expresión de cadherina-DE, embrionaria y materna, impide la formación de todos los epitelios (Uemura *et al.*, 1996; Tepass *et al.*, 1996; Knust y Leptin, 1996).

4.3.2. Papel de las cadherinas en la señalización celular.

La variedad de funciones en las que intervienen las cadherinas hace pensar que además de mediar adhesión celular, también puedan participar en rutas de señalización intracelular, que desencadenen las respuestas fenotípicas.

La homología de la β -catenina y la plakoglobina con la proteína de polaridad segmental *armadillo* de *Drosophila*, que participa en la ruta señalización de Wingless durante la embriogénesis, hizo pensar que la β -catenina pudiera participar en la ruta de señalización de Wnt, homólogo a Wingless en organismos superiores. Wnt y su homólogo Wingless son proteínas secretadas que interaccionan con receptores de membrana, iniciando una cascada que desemboca en la generación de una respuesta, implicada en la polaridad segmental en *Drosophila* y en el patrón dorso-ventral en *Xenopus* (Klingensmith y Nusse, 1994; Moon, 1993).

La idea de la participación de la β -catenina en esta vía surgió porque la inyección en oocitos de *Xenopus* de mRNA de β -catenina era capaz de inducir duplicación del eje axial, al igual que ocurría con la inyección de algunos miembros de la familia Wnt (Funayama *et al.*, 1995). Investigaciones recientes han aportado nuevos datos sobre el mecanismo por el cual

la β -catenina podría participar en esta ruta. Se cree que la transmisión de la señal Wnt, mediante la inhibición de una quinasa citoplásmica, tiene como efecto un aumento de la cantidad de β -catenina libre en el citoplasma (Peifer *et al.*, 1994; Yost *et al.*, 1996; Papkoff *et al.*, 1996). Estudios recientes basados en la técnica del doble híbrido han mostrado que la β -catenina interacciona con el factor de transcripción LEF-1 (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996b) del tipo HMG (Travis *et al.*, 1991). Estudios de sobreexpresión en diferentes sistemas indican que la unión de LEF-1 a β -catenina es suficiente para su translocación nuclear, e igual sucede para XTCTF-3, el homólogo en *Xenopus* de LEF-1 (Molenaar *et al.*, 1996). Asimismo, se ha demostrado la formación de un complejo ternario formado por LEF-1, β -catenina y DNA conteniendo la secuencia consenso para LEF-1 (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que la interacción de β -catenina citoplásmica con el factor LEF-1 y su translocación al núcleo modifica las propiedades transcripcionales de LEF-1, originando la respuesta a la señal. En apoyo de este modelo está el hecho de que la sobreexpresión de LEF-1 en embriones de *Xenopus* provoca también la duplicación del eje embrionario (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996b; revisado en Kühl y Wedlich, 1997).

El papel que las cadherinas desempeñarían en este modelo sería el de secuestrar a la β -catenina, impidiéndola interaccionar con el factor LEF-1 o TCF y realizar su función señalizadora (Fagotto *et al.*, 1996). Por otra parte, la función señalizadora de β -catenina es modulada por APC, que interacciona con ella y dirige su degradación proteolítica (Munemitsu *et al.*, 1995; Rubinfeld *et al.*, 1996). En este sentido, es interesante mencionar que recientemente se ha encontrado actividad transcripcional constitutiva del complejo β -catenina/TCF-4 en células de carcinomas colorrectales con mutaciones en APC o en β -catenina que impiden su degradación (Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997).

4.3.3. Papel de las cadherinas en procesos tumorales, invasión y metástasis.

Las cadherinas son moléculas imprescindibles para el mantenimiento de la arquitectura epitelial de un tejido y, en condiciones normales, las células epiteliales permanecen fuertemente unidas entre sí gracias a estas moléculas. Sin embargo, durante la transformación tumoral la asociación intercelular se desorganiza, las células pierden adhesividad y pueden separarse fácilmente unas de otras. Este hecho favorece la invasión de los tejidos que rodean al tumor.

Experimentos *in vitro*, empleando diversos modelos experimentales, ponen de manifiesto el papel anti-invasivo de las cadherinas, especialmente de la CD-E. Así, la pérdida de expresión de CD-E o el bloqueo de su actividad funcional confiere a las células epiteliales una mayor capacidad invasiva, mientras que la reexpresión de la CD-E en células tumorales deficientes en esta molécula es capaz de inhibir su capacidad invasiva (Behrens *et al.*, 1989; Frixen *et al.*, 1991; Vleminckx *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1992). Por otra parte, la reexpresión de CD-E en células tumorales es capaz de revertir parcialmente el fenotipo

tumoral en algunos tipos celulares (Navarro *et al.*, 1991), mientras que en otros puede hacer disminuir su capacidad metastásica (Mbalaviele *et al.*, 1996). Por todos estos datos se ha sugerido que la CD-E puede ser un potencial gen supresor de tumores.

Análisis *in vivo* confirman que muchos carcinomas (tumores epiteliales) que expresan niveles bajos de cadherinas tienden a ser más invasivos. En general se observa una correlación directa entre la presencia de CD-E y el grado de diferenciación del tumor o línea celular, e inversa entre la CD-E y las propiedades invasivas y metastásicas (Umbas *et al.*, 1992; Brabant *et al.*, 1993; Gamallo *et al.*, 1993; Pizarro *et al.*, 1994; Umbas *et al.*, 1994; revisado en Takeichi, 1993 y en Birchmeier y Behrens, 1994).

En muchas células tumorales, a pesar de existir altos niveles de cadherinas, la función mediada por ellas es baja, debido a otras alteraciones que impiden su función como mutaciones en las cadherinas, observado en carcinomas gástricos (Becker *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1994b), de ovario (Risinger *et al.*, 1994) y de mama (Berx *et al.*, 1995a); deficiencias en α -catenina (Hirano *et al.*, 1992; Breen *et al.*, 1993; Shimoyama *et al.*, 1992; Watabe *et al.*, 1994; Ewing *et al.*, 1995), en β -catenina (Oyama *et al.*, 1994; Kawanishi *et al.*, 1995) o en plakoglobina (Sommers *et al.*, 1994), o bien por modulaciones del complejo cadherina/cateninas mediada por determinados factores (factores de crecimiento, activación de tirosina quinasas, etc). Así, productos de oncogenes como src, ras, fos y met pueden desestabilizar las uniones intercelulares; src y los receptores de EGF y de HGF fosforilan a la β -catenina en residuos de tirosina, lo que lleva a la disociación de los complejos adherentes, modulando así las propiedades adhesivas de las células (Matsuyoshi *et al.*, 1992; Reichmann *et al.*, 1992; Behrens *et al.*, 1993; Hamaguchi *et al.*, 1993; Shibamoto *et al.*, 1994). Este último tipo de regulación puede ser transitorio en algunas etapas del proceso neoplásico, como se ha sugerido durante el proceso de invasión (Takeichi, 1993).

Por otro lado, se ha sugerido que los complejos adherentes cadherina-cateninas funcionales pueden controlar de forma negativa la velocidad de crecimiento celular (Watabe *et al.*, 1994; Zhu y Watt, 1996). Otro mecanismo propuesto por el que las cadherinas podrían influir en el comportamiento invasivo y metastásico de las células tumorales es controlando la actividad de proteasas de la matriz extracelular. Así, se ha observado que la CD-E puede contribuir a la localización del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en los contactos celulares (Jensen y Wheelock, 1992) y que el tratamiento de células de carcinoma que expresan CD-E con un anticuerpo bloqueante anti-CD-E induce un aumento en la secreción de uPA al medio extracelular relacionado con un comportamiento más invasivo (Frixen y Nagamine, 1993). En este sentido, la transfección en una línea de carcinoma de colon con el cDNA de CD-E, además de disminuir su capacidad invasiva, indujo un descenso en la secreción al medio extracelular de la metaloproteinasas MMP-2 (Miyaki *et al.*, 1995).

5. INVASIÓN Y METÁSTASIS: PAPEL DE PROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

La metástasis es la etapa de la progresión tumoral más amenazante para la supervivencia. Actualmente está bien establecido que el desarrollo tumoral y el comportamiento metastásico están bajo controles genéticos independientes, aunque muchas veces relacionados entre sí. La generación de la metástasis es un proceso complejo que abarca diferentes etapas secuenciales: invasión local de las células del tumor primario en el tejido adyacente; acceso a la circulación sanguínea o linfática; extravasación en un órgano distante; y colonización y proliferación de las células dicho órgano. El proceso de invasividad local es, por tanto, indispensable para el desarrollo de la metástasis, y según Liotta consta básicamente de tres etapas: alteración de procesos de adhesión celular (pérdida de adhesión intercelular y adhesión de las células tumorales a la membrana basal), degradación de la membrana basal y migración celular (Liotta *et al.*, 1983; Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Así, la degradación de la membrana basal que rodea los epitelios y del tejido conectivo subyacente es indispensable para la invasión y la metástasis, y es consecuencia de las actividades proteolíticas de diversos sistemas que degradan diferentes componentes de la matriz extracelular.

Destacan cuatro tipos de actividades proteolíticas implicadas en la degradación de la matriz extracelular: serín-proteasas (plasmina y activadores del plasminógeno tipo uroquinasa, uPA, y tisular, tPA), cisteinil-proteasas (catepsinas B, C, H y L), aspartil-proteasas (catepsina D) y metaloproteasas de matriz (MMPs). Los estudios de los últimos años han puesto de manifiesto que las serín-proteasas (uPA) y las MMPs desempeñan un papel primordial en el proceso de invasión en una gran variedad de carcinomas (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Andreasen *et al.*, 1997).

La mayoría de estas proteasas que participan en la degradación de la membrana basal se secretan en forma de precursores inactivos (zimógenos), siendo activados en el medio extracelular por diversos mecanismos que implican proteólisis. Además, la actividad de las diferentes proteasas depende del balance entre ellas y sus inhibidores específicos (TIMPs y serpinas). Por otro lado, la degradación de la MEC se realiza de forma focalizada en las zonas de invasión debido, principalmente, a la existencia de receptores de las proteasas en la superficie celular (Basbaum y Werb, 1996).

Las MMPs constituyen una amplia familia de endopeptidasas dependientes de zinc (o calcio), con bajos niveles de expresión en tejidos adultos, pero cuya expresión aumenta en procesos normales o patológicos de remodelación de tejidos (desarrollo embrionario, reparación de tejidos, ciclo menstrual, inflamación, invasión tumoral y metástasis) (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1993; Birkedal-Hansen, 1995). En función de sus características

estructurales, localización celular y especificidad de sustrato se han clasificado en cuatro subfamilias, reflejadas en la Tabla I.

Las MMPs forman generalmente complejos no covalentes con sus inhibidores, los TIMPs (inhibidores tisulares de MMPs). Hasta la fecha se han identificado 4 miembros (TIMP-1, -2, -3 y -4). TIMP-1 y TIMP-2 actúan específicamente sobre las colagenasas MMP-9 (o gelatinasa B) y MMP-2 (o gelatinasa A), respectivamente (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Las MMPs se secretan en forma inactiva y se activan en el entorno extracelular por proteólisis (Birkedal-Hansen, 1995). Se ha demostrado que la MMP-3 es capaz de activar la proMMP-9 *in vitro* (Ogata *et al.*, 1992). En el caso de la MMP-2, la activación se realiza en la membrana plasmática por interacción con la proteasa de membrana MT-1 MMP, formando un complejo ternario con TIMP-2 (Sato *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1995; Strongin *et al.*, 1995). El uPA también puede actuar activando a varias pro-MMPs (Mazzieri *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha observado que la integrina $\alpha v \beta 3$ (receptor de vitronectina) puede actuar como receptor y activar la MMP-2 en células de melanoma (Brooks *et al.*, 1996).

La expresión de MMPs está controlada por factores que estimulan (IL-1, TNF- α , TGF- α , EGF, FGF y PDGF) o inhiben (TGF- β , IL-4, ácido retinoico, progesterona, glucocorticoides, etc.) su transcripción (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Birkedal-Hansen, 1995). El éster de forbol TPA también puede estimular la expresión de varias MMPs, probablemente por inducción del factor de transcripción AP1 (jun y fos) que actuaría sobre los sitios de unión que existen en los promotores de MMPs como colagenasas o estromelisin (Gutman y Wasylyk, 1990; Matrisian, 1990; Pendas *et al.*, 1997). La EMMPRIN ("Extracellular Matrix Metaloproteinase Inductor"), también llamada basigina, es una proteína transmembrana de la familia de las moléculas de adhesión de las inmunoglobulinas liberada por las células tumorales que induce la expresión de varias MMPs en los fibroblastos del estroma (Biswass *et al.*, 1995). La luz UV también es un potente inductor de la expresión de colagenasa de la dermis *in vivo* (Fisher *et al.*, 1996).

El análisis de la expresión de diferentes metaloproteasas en una variedad de carcinomas ha mostrado la existencia de una fuerte correlación entre la sobreexpresión de algunos miembros y el carácter invasivo los carcinomas (Basset *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1992; Freije *et al.*, 1994; Canete-Soler *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1994; Witty *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1996). Asimismo inhibidores sintéticos de MMPs bloquean el crecimiento tumoral en modelos animales (Wang *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1995). Estos datos, junto con estudios en modelos celulares y experimentales de las MMPs y sus inhibidores (DeClerk *et al.*, 1992; Khokha, 1994) apoyan firmemente su papel activo durante el proceso invasivo.

En concreto, la MMP-9 es producida por varios tipos de células tumorales (Wilhem *et al.*, 1989; Juarez *et al.*, 1991), relacionándose niveles elevados de MMP-9 con una mayor capacidad metastásica (Yamagata *et al.*, 1988; Nakajima *et al.*, 1993; Bernhard *et al.*, 1994;

Tabla I. Clasificación de las principales MMPs y sustratos prioritarios que degradan.

Nombre	Sustratos
Colagenasas intersticiales	
Colagenasa 1 (MMP-1)	Col I, II, III, VII, VIII, X
Colagenasa 3 (MMP-13)	Col I, II, III, IV, FN
MMP-8	?
Estromelisininas	
Estromelisinina 1 (MMP-3)	PG, FN, LN, EL, Col IV, V, IX, X
Estromelisinina 2 (MMP-10)	"
Estromelisinina 3 (MMP-11)	?
Matrilisina (Pump-1, MMP-7)	FN, LN, Col IV, PG
Metalloelastasa (MMP-12)	EL
Gelatinasas/Colagenasas	
Colagenasa IV-A (MMP-2)	Col desnaturalizados, Col IV, V, VII, X, EL, FN
Colagenasa IV-B (MMP-9)	"
MMPs ancladas a membrana (MT-MMPs)	
MT-1 MMP (MMP-14)	Progelatinasa IV-A, colagenasa 3
MT-2 MMP (MMP-15)	?
MT-3 MMP (MMP-16)	?
MT-4 MMP (MMP-17)	?

Todas las MMPs indicadas son secretadas, excepto el grupo de MT-MMPs, que son transmembrana. Abreviaturas: Col, colágeno(s); I-X, tipo de colágeno; PG, proteoglicanos; FN, fibronectina; LN, laminina; EL, elastina.

MacDougall *et al.*, 1995). Por otro lado, la transformación de fibroblastos embrionarios de rata o de fibroblastos NIH3T3 con Ha-ras induce la secreción de colagenasa tipo IV (Garbisa *et al.*, 1987; Ballin *et al.*, 1988; Bernhard *et al.*, 1994).

La MMP-9, a pesar de expresarse en muchos tipos celulares en cultivo, parece estar limitada en condiciones normales esencialmente a células osteoclásticas durante el desarrollo de ratón (Reponen *et al.*, 1994), mientras que en el organismo adulto se ha encontrado en células estromales en el endometrio humano durante ciertas etapas del ciclo menstrual (Rodgers *et al.*, 1994) y en neutrófilos, monocitos y macrófagos (Wilhem *et al.*, 1989).

El sistema uPA también está implicado en la degradación de la matriz extracelular y en los procesos de invasión tumoral. Los activadores del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y tipo tisular (tPA) actúan sobre el plasminógeno inactivo para convertirlo mediante proteólisis en plasmina activa. La plasmina es una proteasa de amplia especificidad de sustrato, que además de participar en la trombolisis, es capaz de degradar muchas proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina y fibrina. También puede catalizar la activación de formas zimógenas de varias MMPs (Mazzieri *et al.*, 1997), que a su vez degradan la membrana basal. Se cree que, mientras que el tPA participa principalmente en la trombolisis, el uPA juega un papel principal en degradación de la matriz extracelular, por lo que el uPA ha sido más estudiado en su relación con el cáncer y la metástasis (revisado en Andreasen *et al.*, 1997).

Muchos sistemas modelo *in vitro* han aportado evidencias sobre el papel del uPA en migración celular e invasión, así como evidencias de su papel causal en procesos metastásicos. Estas evidencias experimentales están apoyadas por el hecho de que en muchos cánceres humanos de mal pronóstico se han encontrado niveles elevados de uPA, de su inhibidor PAI-1 y del receptor de uPA (Blasi, 1993; Andreasen *et al.*, 1997; Scmitt *et al.*, 1997).

6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN SISTEMAS EPITELIALES. EL PROMOTOR DE CD-E.

6.1. Regulación de la expresión de CD-E.

El patrón de expresión espacial y temporal tan complejo de las cadherinas en el organismo, hace necesaria la existencia de mecanismos reguladores de la expresión de las mismas, también complejos y precisos. Además, por su implicación en procesos tumorales es importante conocer sus mecanismos de regulación. Hasta el momento, tan solo se conoce información fragmentaria sobre tales mecanismos. En concreto, nos centraremos en el estudio de los factores que controlan la expresión de la CD-E, ya que ésta juega un papel fundamental en el desarrollo, con un patrón concreto de expresión, y está alterada en un gran número de carcinomas.

Son múltiples los factores que pueden alterar la expresión de los genes de cadherinas, observándose en ocasiones efectos diferentes según el tipo celular analizado. Varios oncogenes pueden inducir desdiferenciación epitelial inhibiendo la expresión de CD-E. Así, células epiteliales transformadas con oncogenes como *ras* pierden la CD-E (Behrens *et al.*, 1989; Vleminckx *et al.*, 1991). La sobreexpresión prolongada del oncogen *fos* en una línea epitelial de mama induce asimismo su desdiferenciación junto con pérdida de CD-E y de otros marcadores epiteliales, a la vez que se adquieren marcadores mesenquimales (Reichmann *et al.*, 1992), mientras que la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa c-erbB2 en células epiteliales de mama inhibe la transcripción del gen de CD-E (D'Souza y Taylor-Papadimitriou, 1994). Por otra parte, se ha descrito que la expresión del gen E1a en una línea celular de rabdomiosarcoma humano induce morfología epiteloide y la expresión de marcadores epiteliales como CD-E (Frisch 1994).

En algunos tipos celulares la expresión de CD-E puede estar controlada hormonalmente. Así, el estradiol regula positivamente los niveles de CD-E en células de granulosa de rata (Blaschuk y Farookhi, 1989), en el ovario de rata (MacCalman *et al.*, 1994) y en una línea humana de próstata (Carruba *et al.*, 1995), mientras que en células de carcinoma de endometrio bien diferenciadas reprime su expresión (Fujimoto *et al.*, 1996).

Otros estudios sugieren que el receptor de EGF (Sorscher *et al.*, 1995), el ácido retinoico (Anzano *et al.*, 1994), el ácido γ -linoleico (Jiang *et al.*, 1995) y la proteína Tax del virus de inmunodeficiencia humano tipo I (HTLV-1) (Kitajima *et al.*, 1996) regulan positivamente la CD-E; mientras que el HGF (Tannapfel *et al.*, 1994) y el TPA (Fabre y García de Herreros, 1993; Brabant *et al.*, 1995) lo hacen negativamente. Por otro lado, en la línea de carcinoma de mama MCF-7 el tratamiento con AMPc aumenta los niveles de CD-E (Revillion *et al.*, 1993), y en tirocitos en cultivo los niveles de mRNA de CD-E aumentan tras el tratamiento con TSH y forskolina, que actúan regulando positivamente la vía del AMPc (Brabant *et al.*, 1995).

El estudio de las regiones promotoras de los genes de cadherinas, que se analizará con más detalle en el Apartado 6.2, constituye otro tipo de abordaje experimental para la caracterización de factores que controlan su expresión. Sin embargo, son los estudios funcionales *in vivo* los que aportan datos más informativos sobre el control de la expresión de las cadherinas, especialmente en el desarrollo, aunque hasta ahora son escasos los trabajos de este tipo. Experimentos de "knock-out" del gen Wnt-1 en ratón indican que en la línea media dorsal del cerebro fetal, Wnt-1 suprime la expresión de CD-E, manteniendo la de α N-catenina (Shimamura *et al.*, 1994). Por otro lado, en *Drosophila*, el factor de transcripción de tipo dedo de zinc Escargot, relacionado con la familia de genes de *snail*, induce la expresión de DE-cadherina al menos en un tipo de células que formarán la tráquea, y probablemente en más tipos celulares (Tanaka-Matakatsu *et al.*, 1996).

6.2. Caracterización de regiones reguladoras del gen de CD-E.

El control de la transcripción del gen de CD-E, tanto murino como humano, ha sido objeto recientemente de varios estudios que se han centrado principalmente en la caracterización de zonas reguladoras situadas en la región 5' o en intrones del gen. Previamente se había localizado el gen de CD-E de ratón en el extremo distal del cromosoma 8 (Eistetter *et al.*, 1988), en una región sinténica al cromosoma 16q humano (16q.22.1), donde se había localizado el gen homólogo humano (Mansouri *et al.*, 1988). Curiosamente el gen de CD-P está localizado en el mismo cromosoma que el de la CD-E (Hatta *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1994b), lo que podría sugerir que compartieran algún tipo de regulación. Los genes de CD-E de ratón (Ringwald *et al.*, 1991), humano (Berx *et al.*, 1995b) y de pollo (L-CAM) (Sorkin *et al.*, 1988) están organizados en 16 exones, distribuidos en una amplia región genómica (más de 40 Kb en ratón y más de 100 Kb en humano), con una estructura intrón/exón muy conservada entre sí, y que no se corresponde estrictamente con dominios estructurales o funcionales definidos de la proteína. En todos los casos el segundo intrón es mucho mayor que el resto (al menos 12 Kb en ratón y 65 Kb en humano).

En 1991 aparecieron los primeros estudios de caracterización de la región promotora de CD-E de ratón, realizados por los grupos de Kemler y Birchmeier (Ringwald *et al.*, 1991; Behrens *et al.*, 1991). El promotor de CD-E de ratón carece de caja TATA y en el sitio de inicio de la transcripción, situado 127 bp en dirección 5' respecto del sitio de inicio de la traducción, se encuentra una secuencia consenso iniciadora. Toda la región situada en 5' respecto a la región transcrita es en general una zona rica en GC, que asemeja a las islas CpG, típicas de genes "housekeeping". Estudios funcionales con distintos fragmentos de la región promotora del gen de CD-E han mostrado que un fragmento que incluye hasta la posición -178 respecto del sitio de inicio de la transcripción (-178 a +92) posee actividad específica epitelial, ya que este fragmento es activo en células epiteliales que expresan CD-E, pero no lo es en células no epiteliales (fibroblastos y células de músculo liso) o en células de carcinoma poco diferenciado que no expresan CD-E (Behrens *et al.*, 1991). Este fragmento del promotor contiene una región rica en GC (posiciones -25/-58), con sitios consenso para SP1 y AP2; una caja CCAAT (en -65); y una secuencia palindrómica llamada E-pal (-75/-86) de 12 bp flanqueada por dos repeticiones invertidas de 4 bp. Las posiciones de la región rica en GC y de la caja CCAAT son similares a las encontradas en otros promotores (Ringwald *et al.*, 1991; Behrens *et al.*, 1991). Estudios iniciales de la región promotora del gen de CD-E humano indican que éste tiene una estructura similar: carece de caja TATA, y posee una región rica en GC, con un sitio de unión a SP1 y una caja CCAAT localizada en la misma posición (-65). El elemento E-pal se encuentra solamente conservado en la mitad 3' y es capaz de unir factores nucleares (Bussemakers *et al.*, 1994a).

Estudios más profundos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la caja CCAAT y los dos sitios AP2 de la región rica en GC actúan estimulando la transcripción del gen de CD-E de ratón, mientras que el elemento E-pal activaría o reprimiría la transcripción, en células epiteliales o mesenquimales, respectivamente (Hennig *et al.*, 1995; Hennig *et al.*, 1996). Asimismo, se ha propuesto la existencia de un elemento amplificador (enhancer) en el primer intrón del gen de CD-E de ratón. Este enhancer estimula la transcripción y une factores nucleares de forma específica solamente en células epiteliales. Tiene una estructura modular con 3 elementos (EI a EIII), dos de los cuales unen AP2 (Hennig *et al.*, 1996). Además se ha sugerido que la transcripción específica epitelial puede estar mediada por la estructura de la cromatina, ya que se han encontrado sitios de hipersensibilidad a DNase I, indicativos de una estructura relajada de la cromatina, alrededor del gen de CD-E específicos de células que expresan dicha molécula (Hennig *et al.*, 1995).

Adicionalmente se han sugerido otros sitios posibles de regulación en el promotor de CD-E de ratón, como sitios de unión al receptor de glucocorticoides y de progesterona (Ringwald *et al.*, 1991) o sitios de unión a LEF-1, de regulación por el complejo β -catenina/LEF-1 (Huber *et al.*, 1996b). Sin embargo, la relevancia funcional de estos sitios de unión aún está por confirmar.

Por otro lado, también se ha propuesto que el estado de metilación endógeno alrededor de la región 5' del gen de CD-E puede ser un mecanismo de inactivación transcripcional, ya que algunas líneas humanas de carcinomas de distinto origen (gástrico, de mama, de próstata, etc) que no expresan CD-E, presentan esta región metilada de forma endógena y el tratamiento con el agente demetilante 5-azacitidina es capaz de inducir, en algunos casos, la expresión de CD-E (Yoshiura *et al.*, 1995; Graff *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1997).

En cuanto a la regulación del gen de CD-E de pollo, L-CAM, se ha identificado el promotor y secuencias enhancer que aportan especificidad tisular (Sorkin *et al.*, 1993), y que son activados por los factores homeobox HoxD9 y HNF-1 (Goemer *et al.*, 1994).

Existen también estudios funcionales del promotor de CD-P (Faraldo y Cano, 1993; Hatta y Takeichi, 1994; Faraldo *et al.*, 1997) que sugieren que puede haber mecanismos comunes en la regulación de los dos tipos cadherinas que expresan los queratinocitos.

6.3. Regulación de la expresión epitelio-específica.

Existe una cuestión abierta sobre cuales son los mecanismos que controlan el fenotipo epitelial y de si existe algún factor/es de transcripción "epiteliogénicos", que confieran o mantengan el fenotipo epitelial, de forma similar a como ocurre en el músculo esquelético, donde los factores de transcripción miogénicos Myo-D y myf-5 mantienen todo un programa de expresión muscular.

En el caso del programa de diferenciación epitelial, aún no se han encontrado tales factores, a pesar de los esfuerzos investigadores. El análisis de promotores y de zonas reguladoras de genes con expresión restringida en sistemas epiteliales, como genes de citoqueratinas o de papilomavirus humano (HPV) 16 y 18 ha sido de gran ayuda en la búsqueda de factores que puedan regular la expresión epitelio-específica (Hoppe-Seyler y Butz, 1994; Byrne, 1997). Los factores de transcripción comunes a estos promotores tienden a ser de tipo genérico, con predominio de AP1, AP2 y SP1. Aunque algunos de estos factores están enriquecidos en tejidos epiteliales, tienen patrones de expresión adicionales en otros tipos de tejidos. Por tanto, la especificidad epitelial podría llevarse a cabo mediante la combinación factores de transcripción no exclusivos de células epiteliales. (Byrne, 1997; Davies y Garrod, 1997). Aún así, también se han encontrado algunos factores de transcripción epitelio-específicos o que contribuyen a la especificidad epitelial, como pueden ser: KRF-1 (Mack y Laimins, 1991); los factores tipo dedos de zinc basonuclina y EZF, expresados en queratinocitos (Tseng y Green, 1994; Garrett-Sinha *et al.*, 1996); las proteínas con dominios Pou de unión a octámeros Oct 11 (Skin 1a-i o Epoc-1) y Oct-6 (Andersen *et al.*, 1993; Yukawa *et al.*, 1993; Faus *et al.*, 1994); o el factor KSF, recientemente identificado, exclusivo de epitelios escamosos estratificados (Nakagawa *et al.*, 1997), entre otros.

En el caso de la CD-E, se ha sugerido que la especificidad epitelial viene conferida en parte por el elemento E-pal, que contiene dos cajas E (secuencia consenso CANNTG), de unión a factores tipo hélice-lazo-hélice básico (bHLH) (Hennig *et al.*, 1996). Max es una proteína de tipo bHLH que puede homodimerizar o asociarse con miembros de la familia Myc o con las proteínas relacionadas Mad (Mad1, 3 y 4) y Mxi1. Tanto los complejos Max/Myc como los complejos Max/Mad (o Max/Mxi1) pueden unirse a las caja E, pero los primeros activan la transcripción y promueven la proliferación celular, mientras que los segundos promueven represión transcripcional (Ryan y Birnie, 1996). Se ha encontrado que en la epidermis existe una compartimentalización de estos factores con expresión de c-Myc en las capas basales, Mad en estratos suprabasales y Mxi1 en ambos (Hurlin *et al.*, 1995a; Hurlin *et al.*, 1995b; Gandarillas y Watt, 1995). Así, en las capas basales proliferantes de la epidermis, predominarían los complejos transcripcionalmente activos c-Myc/Max, mientras que en las capas diferenciadas predominarían los complejos Mad/Max.

AP2 es un factor de transcripción inducible por ácido retinoico que contiene un dominio de dimerización tipo hélice-tramo-hélice (HSH) y una región básica adyacente de unión a DNA (Williams y Tjian, 1991). También se ha otorgado a AP2 un papel en la expresión específica epitelial, debido a su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario, principalmente en piel y en derivados de la cresta neural, y a que se han encontrado secuencias de unión a AP2 en muchos promotores de genes expresados en la epidermis (Leask *et al.*, 1991; Meier *et al.*, 1995). Sin embargo, ratones mutantes nulos para

el gen AP2 no muestran anomalías en la epidermis, sino que mueren principalmente por defectos craneo-faciales (Zhang *et al.*, 1996; Schorle *et al.*, 1996).

Por otro lado, también son interesantes en este sentido los miembros de la familia Ets. La familia Ets de factores de transcripción comprende un amplio número de miembros, todos ellos caracterizados por la presencia de un dominio de unión a DNA, el dominio Ets, que interacciona específicamente con secuencias de DNA que contienen el trinucleótido común GGA. Las secuencias de DNA flanqueantes a este núcleo común son variables y se cree que ayudan a determinar el tipo de proteína Ets que se unirá (Wasylyk *et al.*, 1993). La homología entre los distintos miembros es muy baja fuera del dominio Ets, pudiéndose establecer grupos de factores similares dentro de la familia (Macleod *et al.*, 1992). La familia Ets está implicada en la regulación de la expresión génica en numerosos y variados procesos biológicos (desarrollo embrionario, diferenciación, angiogénesis, control del ciclo celular, etc), y la pérdida del control normal los puede convertir en oncoproteínas. Se han encontrado sitios de unión a factores Ets que regulan la transcripción de numerosos promotores de genes (muchos de ellos específicos de tejidos epiteliales) y casi siempre actúan en asociación con otros factores de transcripción, generalmente AP1 (Wasylyk *et al.*, 1990; Wasylyk *et al.*, 1993; Gum *et al.*, 1996).

Ets-1 fué el primer miembro de la familia identificado. Su patrón de expresión en células mesodérmicas en el embrión de ratón y en tumores humanos, específicamente en las zonas de transición epitelio-mesénquima sugiere un papel para esta molécula en procesos dinámicos de invasión y migración (Kola *et al.*, 1993; Wernert *et al.*, 1994). Recientemente se ha detectado expresión de Ets-1 en células epiteliales del embrión de pollo transitoriamente, en zonas de migración (migración de las células de la cresta neural y dispersión de las somitas en el esclerotomo mesenquimal), lo que apoya su papel en procesos migratorios y de transición epitelio-mesénquima (Fafeur *et al.*, 1997).

E1AF es otro miembro de la familia recientemente caracterizado que puede jugar también un papel importante en procesos invasivos, ya que activa la transcripción de varias MMPs y su transfección induce en la línea no invasiva MCF-7 motilidad, invasividad y un aumento en la expresión de la metaloproteasa MMP-9 (Kaya *et al.*, 1996).

El grupo de factores PEA 3 está formado por tres miembros de la familia Ets: PEA3, ERM y ER81. ERM es prácticamente ubicuo en ratón y humano, mientras que los otros dos miembros muestran un patrón más restringido de expresión (de Launoit *et al.*, 1997). En concreto, en el ratón adulto, ER81 se expresa principalmente en cerebro y riñón (Monté *et al.*, 1994); mientras que el factor PEA 3 de ratón se expresa en fibroblastos y en algunas células epiteliales en cultivo, y en el ratón adulto la expresión está restringida a epidídimo y cerebro (Xin *et al.*, 1992). Es interesante destacar que, a pesar de ser negativo en epitelio normal de mama, PEA 3 se ha encontrado sobreexpresado en adenocarcinomas de mama inducidos en ratones transgénicos para el oncogén neu/c-erbB-2, así como en algunas líneas de carcinoma de mama humanas y de ratón (Trimble *et al.*, 1993; Baert *et al.*, 1997).

Por último, recientemente se ha aislado y caracterizado un nuevo miembro de la familia específico de células epiteliales: ESE-1 (Oettgen *et al.*, 1997). ESE-1 contiene el dominio Ets de unión a DNA y además un dominio de tipo "gancho A/T", encontrado en proteínas de la familia HMG y en otros factores nucleares (Reeves y Nissen, 1990). ESE-1 es el primer factor de la familia Ets expresado exclusivamente en células epiteliales. Además ESE-1 se induce durante la diferenciación terminal que sufren los queratinocitos en cultivo cuando se aumenta la concentración de calcio (Oettgen *et al.*, 1997).

Sin embargo, la realidad de no haberse encontrado hasta la fecha ningún factor epiteliogénico claro, junto con el hecho de que las primeras células del embrión son en sí epiteliales, originando los demás tipos celulares por segregación y diferenciación a partir de ellas, ha hecho surgir la hipótesis, mantenida por Frisch (1997) de que el estado epitelial es el estado "por defecto", y de que, por tanto, no hace falta ningún factor específico que mantenga este fenotipo. Sin embargo esta es una hipótesis tentadora que tendrá que ser comprobada.

7. EL MODELO DE CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN.

El modelo experimental de la carcinogénesis química de piel de ratón ha constituido un paradigma para establecer las bases biológicas de la naturaleza multiseccional del cáncer. Este modelo se basa en la inducción progresiva de tumores por tratamiento de la piel de los ratones con una dosis única de un carcinógeno químico como DMBA (iniciador) y posteriores aplicaciones de un promotor tumoral, generalmente el éster de forbol TPA. Estos tratamientos originan papilomas benignos que pueden progresar espontáneamente hacia carcinomas epidermoides malignos con diferente grado de diferenciación (Yuspa, 1994). Los últimos estadios de progresión en este sistema están representados por la aparición de carcinomas fusiformes indiferenciados (Buchman *et al.*, 1991). Aunque la aparición de metástasis en este modelo es un evento raro, se ha observado su generación a partir de carcinomas epidermoides y fusiformes (Klein-Szanto, 1991). Estudios exhaustivos de los últimos años han permitido establecer la naturaleza de algunas de las alteraciones génicas asociadas a estadios de progresión definidos en este sistema, como la activación de Ha-ras en la iniciación y la inactivación de p53 en la transición de papilomas a carcinomas, incremento en las dosis de Ha-ras oncogénico y adquisición de trisomías en los cromosomas 6 y 7 durante la progresión tumoral (Fig.4) (revisado en Portella *et al.*, 1994). La participación de Ha-ras en el proceso de iniciación se puso de manifiesto porque el carcinógeno químico iniciador puede sustituirse por la aplicación de HaMSV (virus del sarcoma murino de Ha-ras) (Brown *et al.*, 1986). La posibilidad de obtener líneas celulares a partir de los tumores inducidos por este sistema facilita el estudio de los mecanismos implicados en la carcinogénesis de piel. Asimismo, cultivos primarios de queratinocitos de ratón pueden transformarse *in vitro*, por ejemplo, por tratamiento con

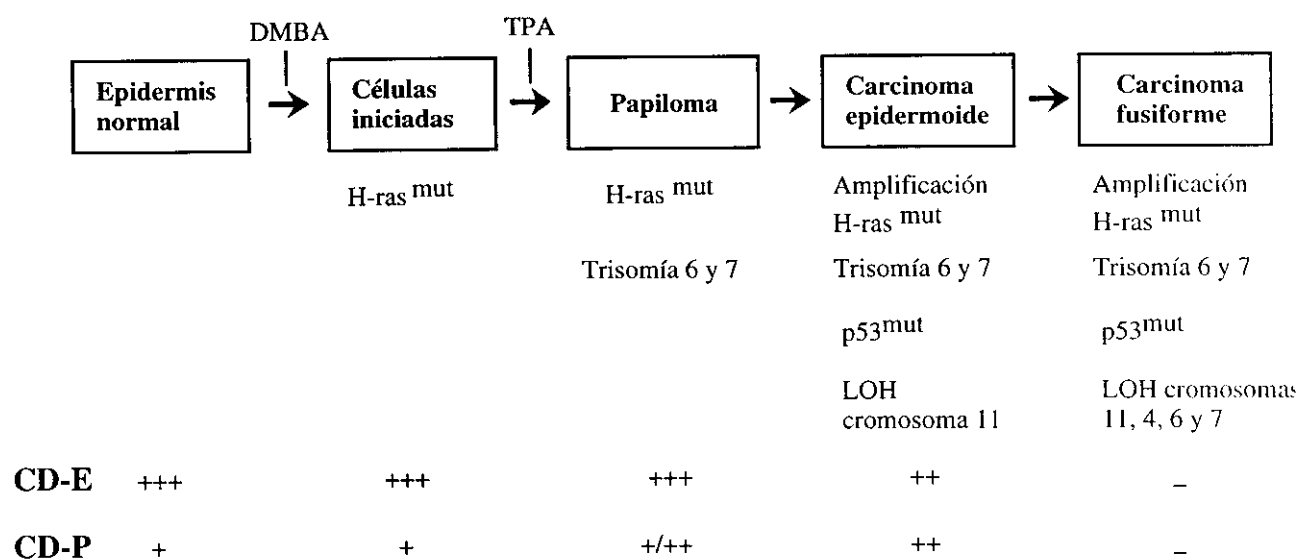


Fig. 4. Estadios de progresión en el modelo de la carcinogénesis química de piel de ratón. Se indican las principales alteraciones génicas y la expresión de cadherinas. LOH, pérdida de heterozigosidad.

carcinógenos químicos o por transfección con Ha-ras. De esta forma pueden obtenerse líneas celulares en cultivo representativas de distintos estadios de la progresión tumoral.

El estudio previo de la expresión de cadherinas en la piel normal y en carcinomas mostró que en la epidermis normal se expresan tanto CD-E como CD-P (Fig. 4); la expresión de CD-E disminuye durante la progresión a carcinoma epidermoide; y la expresión de ambas moléculas desaparece en el último estadio de la progresión, carcinoma fusiforme (Navarro *et al.*, 1991; Ruggeri *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1996). Asimismo, estudios de otros marcadores de diferenciación de epidermis pusieron de manifiesto la expresión aberrante de la integrina $\alpha 6 \beta 4$ (Gómez *et al.*, 1992; Tennenbaum *et al.*, 1993) y de la queratina K13 (Giménez-Conti *et al.*, 1990) en estadios tempranos de progresión; y de la queratina K8 en estadios posteriores (Larcher *et al.*, 1992; Caulín *et al.*, 1993). La mayoría de los marcadores epiteliales analizados (incluyendo cadherinas, integrina $\alpha 6 \beta 4$, queratinas y plakoglobina) se pierden en los carcinomas fusiformes y líneas derivadas (Navarro *et al.*, 1991; Gómez *et al.*, 1992; Díaz-Guerra *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1993; Stoler *et al.*, 1993), mientras que se adquieren marcadores típicos de células mesenquimales como fibronectina y su receptor $\alpha 5 \beta 1$ (Gómez *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1995). Por tanto, la transición fenotípica epitelio-fibroblasto que ocurre en los últimos estadios de progresión de la carcinogénesis de piel de ratón es similar en muchos aspectos a las transiciones epitelio-mesénquima que ocurren durante el desarrollo embrionario (Hay, 1995; Birchmeier *et al.*, 1996).

Por otro lado, estudios previos en este modelo muestran una correlación inversa entre la expresión de CD-E y el grado de tumorigenicidad, así como con la capacidad invasiva *in vitro* de las células (Navarro *et al.*, 1991; Ruggeri *et al.*, 1992; Caulín *et al.*, 1996). El importante papel de la CD-E en la progresión tumoral se puso de manifiesto mediante estudios de transfección del cDNA de CD-E en la línea derivada de carcinoma epidermoide HaCa4, que no expresaba CD-E. Esta transfección revirtió parcialmente la tumorigenicidad y originó un fenotipo más diferenciado (Navarro *et al.*, 1991). Sin embargo, todas las líneas originadas, que expresaban CD-E, permanecieron metastásicas, al igual que la línea parental, con la excepción de la línea E24, que se volvió no metastásica. Esta línea, además de reexpresar CD-E, había disminuido de forma considerable los niveles de Ha-ras viral y de la proteína p21 ras (Caulín *et al.*, 1996). Queda abierta la cuestión de si en este sistema niveles reducidos de Ha-ras son suficientes para evitar el fenotipo metastásico, o si además la presencia de la molécula de adhesión CD-E es también necesaria.

OBJETIVOS

Los estudios previos sobre la expresión de cadherinas en el modelo de carcinogénesis de piel de ratón habían puesto de manifiesto la importancia de la molécula de adhesión celular cadherina E en la carcinogénesis, existiendo pérdida de la expresión de dicha molécula durante la progresión tumoral. Sin embargo no estaba claro el papel específico que podía desempeñar en el comportamiento metastásico. Por otra parte, se desconocían cuales son los mecanismos que controlaban la pérdida de expresión de cadherina E durante la progresión maligna.

Por lo tanto, nos planteamos los siguientes objetivos al inicio de la realización de esta Tesis:

1. Estudio de la influencia de la cadherina E en el fenotipo invasivo y metastásico en la carcinogénesis de piel de ratón.
2. Análisis de la regulación génica de cadherina E durante la progresión tumoral. Caracterización de los factores implicados que actúan en cis o en trans.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS.

Los productos químicos y bioquímicos fueron adquiridos de las casas comerciales Amersham, BAbCO, Bio 101 Inc., Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Carlo Erba, Du Pont, Gibco BRL, Invitrogene, Jackson, L.K.B., Merck, Millipore, Nucleopore, Pharmacia, Probus, Promega Corporation, Quiagen, Santa Cruz Biotechnology y Sigma Chemical Co. Cuando se considera oportuno se indica en la descripción la casa comercial. Todos los reactivos utilizados en la experimentación fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y cultivo celular.

2. TAMPONES Y SOLUCIONES.

La composición de la mayoría de los tampones y soluciones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de métodos o en las citas correspondientes. La composición de algunas de las soluciones más comunes, no especificada más adelante, se describe a continuación.

- **Solución de Denhardt** (1x): 0.2 g/l BSA (fracción V, Sigma), 0.2 g/l Ficoll-400 (Pharmacia), 0.2 g/l polivinil-pirrolidona.
- **HBS 2x**: 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM Hepes pH 7.12.
- **HMF-Ca²⁺**: 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Hepes pH 7.4.
- **Tampón de carga Laemmli**: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerol, 0.005% azul de bromofenol.
- **NET**: 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 0.05% NP-40, 0.25% gelatina.
- **PBS** : 136 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4.
- **TBE** (1x): 90 mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8.0.
- **TBS**: 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6.
- **Tris-glicina** (1x): 192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8.7.
- **T-TBS**: 0.05% Tween-20 en TBS.
- **SSC** (1x): 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico.

3. MEDIOS EMPLEADOS EN CULTIVO DE CÉLULAS.

- Medio de cultivo DMEM - Gibco BRL.
- Medio de cultivo Ham's F12 suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales - Gibco BRL.

4. LÍNEAS CELULARES.

Las líneas celulares utilizadas, a excepción de la línea fibroblástica NIH3T3, son queratinocitos de ratón obtenidos por diferentes abordajes (Fig. 5) y con distinto grado de tumorigenicidad (Tabla II). MCA3D es una línea no tumorigénica; PDV y E24 presentan tumorigenicidad intermedia; y el resto son altamente tumorigénicas. La mayoría de las células presentan una morfología epitelial o epiteloide, excepto CarB y MSC11A5 que exhiben un fenotipo fibroblastoide. El origen y propiedades de todas estas líneas han sido descritos previamente (Navarro *et al.*, 1991; Caulín *et al.*, 1996; Díaz-Guerra *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 1991; Stoler *et al.*, 1993) y aparece esquematizado en la Figura 5 y en la Tabla II.

Tabla II. Características morfológicas, tumorigénicas y expresión de cadherinas de las líneas celulares empleadas en esta tesis.

Línea celular	Morfología	Tumorigenicidad ⁽¹⁾	CD-E ⁽²⁾	CD-P ⁽²⁾
MCA3D	Epitelial	-	++	+/++
PDV	Epitelial	+	+	+++
HaCa4	Epiteloide	++	-	++
Neo3	Epiteloide	++	-	++
E58	Epiteloide	++	-	++
E62	Epitelial	+	++	++
E24	Epitelial ⁽³⁾	+	+/++	+++
CarB	Fibroblastoide	++	-	-
MS11A5	Fibroblastoide	++	-	-

(1) La capacidad tumorigénica se determinó por inyección en ratones nu/nu, teniendo en cuenta el número de tumores originados y el período de latencia.

(2) Los niveles relativos de CD-E y de CD-P se estimaron a partir de datos de Northern-blot y de inmunoblot.

(3) La línea celular E24 muestra propiedades de pseudo-estratificación en cultivo.

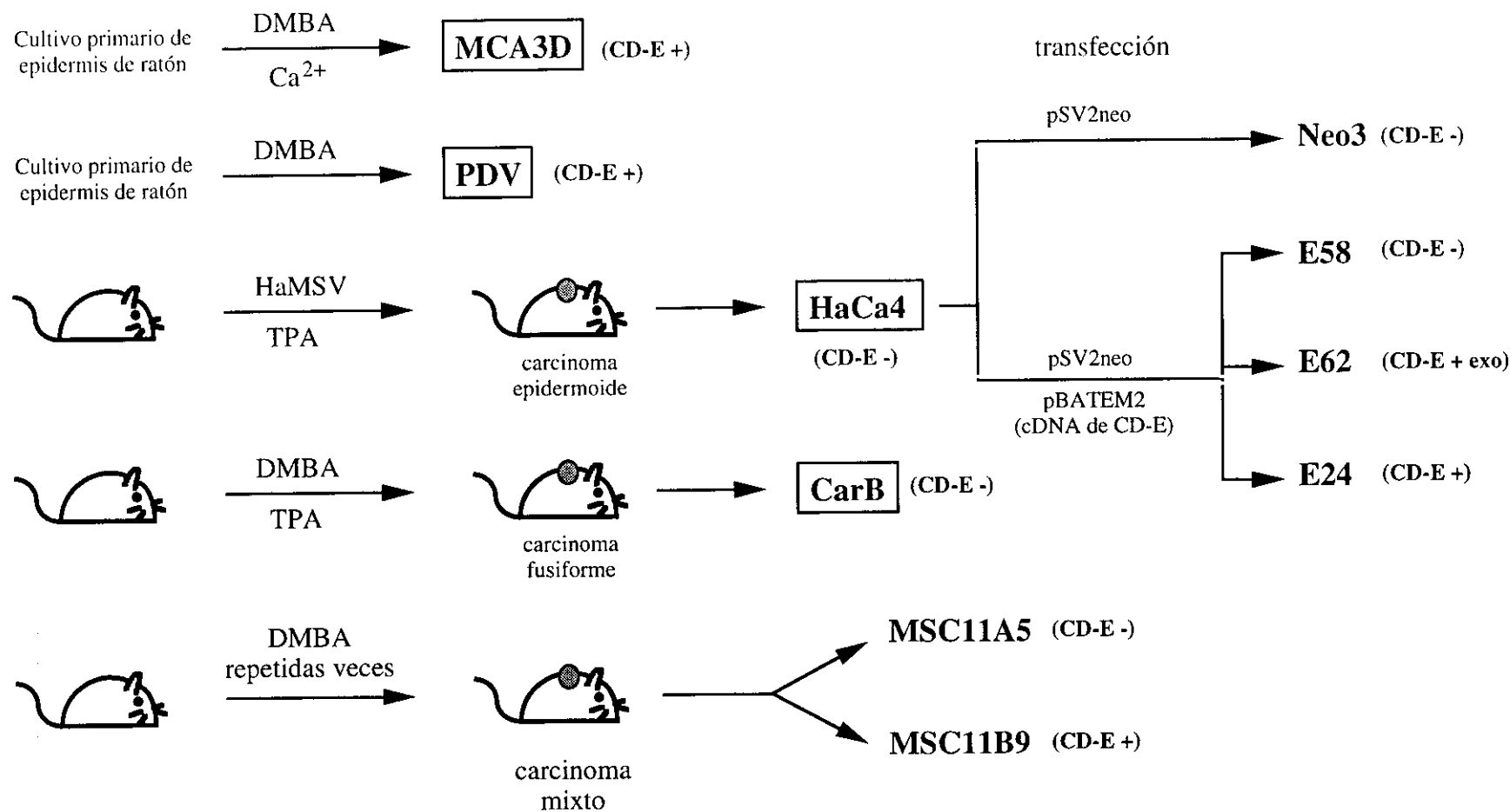


Figura 5. Representación esquemática del origen de las líneas celulares empleadas en esta Tesis. Se indica si las líneas celulares originadas expresan (CD-E +) o no expresan (CD-E -) CD-E. Exo, CD-E exógena. Ver texto para más detalles.

5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para los ensayos de tumorigenicidad se utilizaron ratones atímicos nu/nu de la cepa Swiss (suministrados por IFA.Credo, Barcelona) entre 8 y 10 semanas de edad. Para los experimentos de inducción de metástasis espontánea se utilizaron ratones atímicos BALB/c de 8 semanas de edad (suministrados por el Area de Producción Animal del CRIFFA Inc., Lyon, Francia) y los experimentos se realizaron en el Departamento de Invasión y Metástasis del IRO (Barcelona). Los animales se mantuvieron en condiciones de esterilidad.

6. ANTICUERPOS Y REACTIVOS INMUNOLÓGICOS.

6.1. Anticuerpos primarios:

- **ECCD-2:** anticuerpo monoclonal de rata anti-cadherina E de ratón, cedido por el Dr. M. Takeichi (Universidad de Kyoto, Japón). La dilución a la que se emplea este anticuerpo varía entre 1:100 y 1:250.
- **PCD-1:** anticuerpo monoclonal de rata anti-cadherina P de ratón, cedido asimismo por el Dr. M. Takeichi. La dilución empleada osciló entre 1:10 y 1:20.
- **Anti-involucrina:** antisuero policlonal de conejo anti-involucrina suministrado por BAbCO. La dilución empleada fue 1:100.
- **Ets-1/Ets-2 (C-275):** anticuerpo policlonal de conejo anti-Ets-1 purificado por afinidad. Presenta alta reactividad cruzada con otros miembros de la familia Ets. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology.
- **AP2 (C-18) X:** anticuerpo policlonal de conejo anti-AP2 purificado por afinidad. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology. Concentrado para ensayos de super-retardo en gel.
- **SP1 (PEP 2):** IgG policlonal de conejo anti-SP1. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology. Concentrado para ensayos de super-retardo en gel.

6.2. Anticuerpos secundarios:

- Antisuero de cabra anti-IgG de rata conjugado a rodamina (Jackson) para los ensayos de inmunofluorescencia.
- Antisuero de oveja anti-Ig de rata y antisuero de burro anti-Ig de conejo conjugados a peroxidasa (Amersham) para ensayos de inmunoblot.
- Antisuero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) para inmunoblot.
- Antisuero de oveja anti-Ig de rata marcado con ^{125}I (Amersham), igualmente para inmunoblot.

7. SONDAS EMPLEADAS EN EXPERIMENTOS DE NORTHERN-BLOT.

- **CD-E:** fragmento de 0.9 Kb obtenido por digestión del plásmido pBATEM-2 (ver más adelante, Apto. 8) con la enzima de restricción BamHI. Contiene las secuencias codificantes de los nucleótidos 993 a 1920 del cDNA de CD-E de ratón.
- **CD-P:** fragmento correspondiente a las secuencias codificantes de los nucleótidos 1281 a 2469, así como secuencias no codificantes del cDNA de CD-P de ratón. Obtenido por digestión del plásmido p β act-Pcad (ver Apto. 8) con HindII-EcoRI.
- **Ha-ras:** se empleó el plásmido BS9 (Ellis *et al.*, 1980) que detecta Ha-ras viral y celular de ratón.
- **MMP-9:** obtenida a partir del plásmido pGEL 2SK(-) (Tanaka, H. *et al.*, 1993) que contiene el cDNA de la gelatinasa de ratón de 105 KDa (MMP-9). Se empleó un fragmento de 3.2 Kb obtenido por digestión con NotI/EcoRI.
- **MMP-3:** obtenida por RT-PCR a partir de mRNA de células NIH3T3 según la secuencia del cDNA de transina-1 de ratón (Ostrowski *et al.*, 1988). Comprende los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 896 y 1238.
- **TIMP-1:** generada por RT-PCR a partir de mRNA de células NIH3T3. Contiene secuencias comprendidas entre las posiciones 236 y 455 de TIMP-1 de ratón (Edwards *et al.*, 1986).
- **β -actina:** sonda de 500 bp del cDNA de β -actina de ratón.
- **GADPH:** sonda de 983 bp del cDNA de GADPH de ratón, obtenida por RT-PCR según se describe en Wilson *et al.* (1995).

8. PLÁSMIDOS.

8.1. Plásmidos empleados en la obtención de transfectantes estables.

- **pBATEM-2** (Nose *et al.*, 1988): contiene el cDNA de CD-E de ratón bajo el control del promotor de β -actina.
- **p β ac-Pcad** (Nose *et al.*, 1988): plásmido de expresión con el cDNA de CD-P de ratón bajo el control del promotor de β -actina. Los plásmidos pBATEM-2 y p β ac-Pcad fueron cedidos amablemente por el Dr. M Takeichi.
- **p β ac-dacE:** contiene secuencias del cDNA de CD-E de ratón (posiciones 640 a 3170) en posición antisentido respecto al promotor de β -actina. Su generación se describe en Resultados (Apto 1.1).
- **pBSpac Δ P** (Luna *et al.*, 1988): vector de expresión del gen PAC (puromicina N-acetil transferasa) que confiere resistencia al antibiótico puromicina. Este plásmido fue cedido por el Dr. J. Ortín (CNB, Madrid).

8.2. Plásmidos empleados en los experimentos de transfección transitoria.

8.2.1. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-E.

Los plásmidos **-1.4**, **-0.8**, **-178**, **-94**, **-78**, **-58** y **-21** de CD-E (Behrens *et al.*, 1991; Hennig *et al.*, 1996) contienen secuencias de la región promotora del gen de CD-E de ratón. El extremo 3' es común en todas ellas, y corresponde con la posición +92 del gen de CD-E de ratón, tomando como +1 el sitio de inicio de la transcripción. La posición del extremo 5' corresponde con el nombre del plásmido (expresado en pb, excepto los plásmidos -1.4 y -0.8 en Kb). Estos fragmentos están clonados en el vector pCAT-Basic (Promega) justo delante del gen de expresión de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

Los plásmidos **mE-pal**, **Δ E-pal**, **mut GC1** y **mut GC2** se derivaron a partir del plásmido **-178**. En el plásmido **m-Epal** (Hennig *et al.*, 1996) los dos nucleótidos centrales GC de la secuencia palindrómica E-pal del promotor de CD-E se sustituyeron por TT. En los plásmidos **mut GC1** y **mut GC2** (Hennig *et al.*, 1995), la secuencia rica en GC (posiciones -32 a -58) del promotor de CD-E:

-58 GCGGCGCCGGGGGCGGTGCCTGCGGGC -32

se sustituyó por las secuencias mutadas:

mut GC1 GCGGCGCCGTTTTCGGTGCCTGCGGGC

mut GC2 GCGGCGCCGGGGGCGACTTCTGCGGGC

El plásmido **Δ E-pal** se construyó eliminando la secuencia -103 a -79 del promotor de CD-E por digestión del plásmido -178 con PstI, romando los extremos con T4 DNA polimerasa y religando.

Todos estos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. J. Behrens (Centro Max-Delbrück de Medicina Molecular, Berlín).

El plásmido **m-Ets** también tiene como base el plásmido -178 y contiene una doble mutación en las posiciones -93/-94, en las que los nucleótidos CC del potencial sitio de unión a c-Ets1 se sustituyeron por los nucleótidos AA. Este plásmido se generó en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida por PCR (Innis *et al.*, 1990). En la figura 6 se muestra un esquema de la estrategia seguida para la generación de este mutante: El plásmido -178 se utilizó como DNA molde en las reacciones de PCR 1 y 2. La PCR 1 se realizó con los oligonucleótidos rev y mEts-2 (ver Apto. 9.1) como cebadores, y la PCR-2 con los oligonucleótidos mEts-3 y mEts-4. Las condiciones de PCR fueron 30x (94°C 1'30", 45°C 3', 72°C 3'). Los fragmentos generados en ambas reacciones de PCR se purificaron en gel de agarosa y se emplearon como DNA molde para la PCR 3, que se realizó en las mismas condiciones y empleando como cebadores los oligonucleótidos rev y mEts-4. El fragmento generado se purificó en gel de agarosa. Este fragmento se sustituyó por el endógeno del plásmido -178 tras digestión con los enzimas HindIII y NotI y posterior ligación. Se comprobó la correcta secuencia del plásmido m-Ets por digestión (pérdida de sitio StyI) y secuenciación.

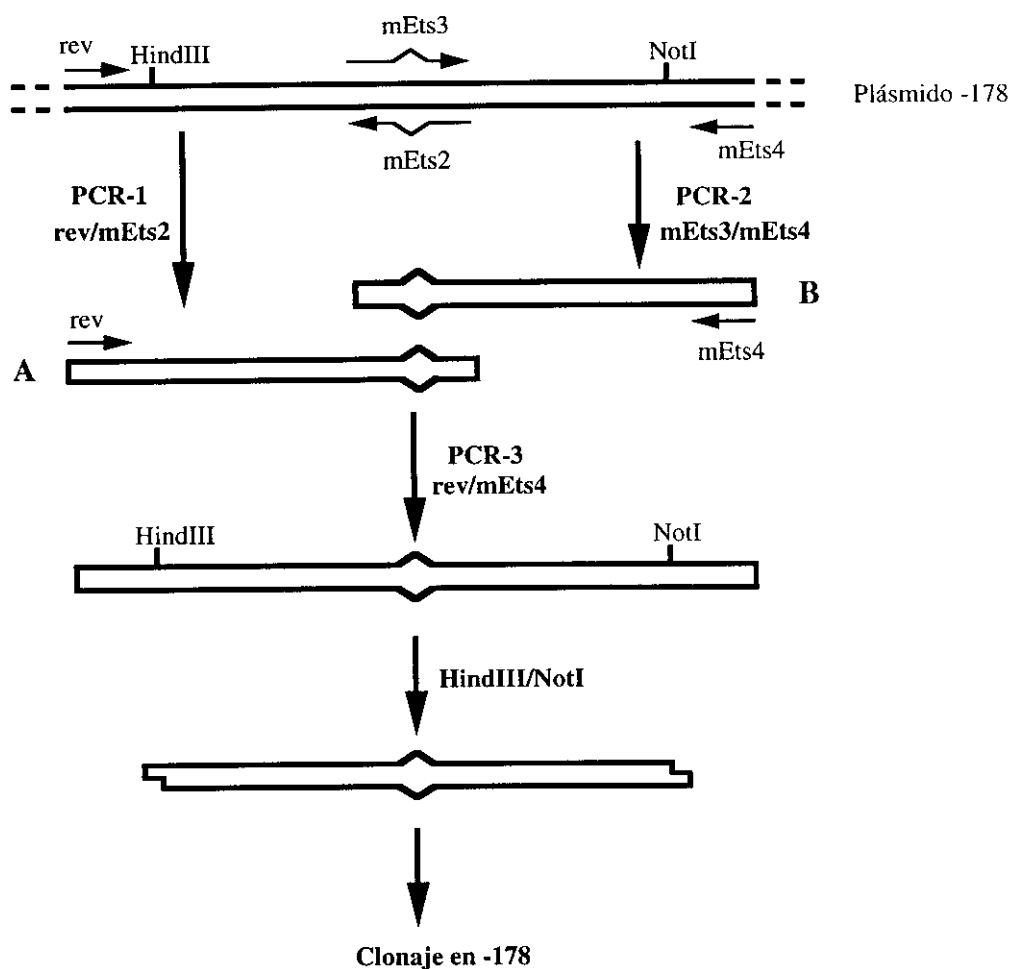


Figura 6. Diseño experimental para la construcción del plásmido m-Ets mediante mutagénesis por PCR. El plásmido -178 se empleó como molde para las reacciones de PCR 1 y 2 con los oligonucleótidos cebadores que se indican. Los cebadores mEts2/mEts3 portan la mutación a introducir en el sitio consenso Ets (^). Los productos de las reacciones A y B sirvieron como molde para la PCR 3 con los cebadores indicados. El producto generado, que porta la mutación, se digirió con los enzimas *HindIII*/*NotI* para reemplazarlo por el fragmento silvestre en plásmido -178.

8.2.2. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-P.

Los plásmidos **-200P** y **-75P** de CD-P (Faraldo *et al.*, 1997) contienen las secuencias del promotor de CD-P de ratón comprendidas entre los nucleótidos -200/+47 y -75/+47, respecto del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias se insertaron en posición 3' del gen de la luciferasa en el vector pXP1 (Nordeen, 1988).

La construcción híbrida **GC-E/-75P** se generó insertando el oligonucleótido GC-E del promotor de CD-E (posición -60/-23, ver Oligonucleótidos) en el sitio BamHI del plásmido -75P, en posición 5' del promotor de CD-P. La construcción híbrida **E-pal/-200P** se generó insertando un oligonucleótido conteniendo la secuencia E-pal del promotor de CD-E (posición -92/-69, ver Oligonucleótidos) en el sitio XhoI del plásmido -200P, en posición 5' del promotor de CD-P (Faraldo *et al.*, 1997).

8.2.3. Plásmidos control en los experimentos de actividad promotora de CD-E y de CD-P.

- **pCAT-Control Vector** (Promega): vector de expresión de CAT bajo el control del promotor de SV40. Se empleó para normalizar los niveles de actividad CAT dirigidos por las construcciones del promotor de CD-E entre las distintas líneas celulares.
- **CMV-luc**: vector de expresión de la enzima luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), donado por la Dra. P. Santisteban (IIB, Madrid). Se utilizó para medir la eficiencia de transfección y para normalizar la actividad del promotor de CD-P entre las diferentes líneas celulares.
- **RSV-βgal** (Promega). Vector de expresión de la enzima βgalactosidasa bajo el control del promotor de RSV. Se empleó para medir la eficiencia de transfección.

8.2.4. Vectores de expresión empleados en los experimentos de cotransfección.

- **pSG5-ERM** (Monté *et al.*, 1994): vector de expresión de ERM bajo el control del promotor de SV40, clonado en el vector pSG5. El vector vacío **pSG5** (Pharmacia) contiene el promotor temprano de SV40 unido a secuencias no codificantes y se empleó como control en los ensayos de cotransfección con pSG5-ERM.
- **AP2-ΔTA** (Hennig *et al.*, 1996): vector de expresión del factor AP2 (Willians, y Tjian, 1991) con el dominio de transactivación delecionado, bajo el control del promotor de RSV. Como control para normalizar las cantidades de DNA transfectadas se empleó el vector vacío **RSV-0**, que contiene el promotor RSV unido a secuencias no codificantes.
- Los vectores de expresión de Max y c-Myc humano **pMTmax** y **pHEBoMTmyc2,3** (Grignani *et al.*, 1990), respectivamente, contienen el cDNA de dichos factores bajo el control del promotor de metalotioneína I de ratón, en el vector vacío **pHEBoMT**. Estos plásmidos fueron donados amablemente por el Dr. J. León (Universidad de Cantabria, Santander).

- Los vectores de expresión de Slug y Snail de pollo **CMV-sna** y **CMV-slug**, respectivamente, contienen los cDNA de dichos factores bajo el control del promotor de CMV. Los cDNAs de snail y slug, clonados en el vector pBS-SK (cedidos por A. Nieto, Instituto Cajal, Madrid) se aislaron por digestión con HindIII/XbaI y ApaI/NotI, respectivamente y se insertaron en el vector vacío pcDNA3 (Invitrogene). El vector **pcDNA3** se empleó como control, y para igualar las cantidades de DNA a transfectar, en los experimentos de cotransfección.

9. OLIGONUCLEÓTIDOS.

9.1. Oligonucleótidos empleados en la generación del plásmido m-Ets.

Para la construcción del plásmido m-Ets se emplearon los siguientes oligonucleótidos en las reacciones de PCR. Los oligonucleótidos mEts-2 y mEts-3 corresponden a la cadena no codificante y codificante, respectivamente, de las posiciones -111/-82 del promotor de CD-E conteniendo una doble mutación en el sitio consenso Ets. Los oligonucleótidos rev y mEts-4 son oligonucleótidos, de la cadena codificante y no codificante respectivamente, situados en los extremos de la zona a amplificar por PCR; rev está situado en la zona 5' del polilinker del vector, y mEts-4 en la posición -3/+17 del promotor de CD-E.

rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
mEts-2	5'-AGGTGGCAGCCAATTAAGTGCAGGGCCCTC-3'
mEts-3	5'-GAGGGCCCTGCAGTTAATTGGCTGCCACCT-3'
mEts-4	5'-GCGGCTCCCACACCAGTGAG-3'

9.2. Oligonucleótidos y fragmentos de DNA empleados en experimentos de retardo en gel.

Los oligonucleótidos o fragmentos de DNA empleados en los experimentos de retardo en gel y de competición se describen a continuación. Todos los oligonucleótidos están escritos en dirección 5'-3'. Para realizar los ensayos cada oligonucleótido descrito se hibridó con su complementario, antes de la reacción de marcaje. Para los oligonucleótidos y fragmentos de los genes de CD-E y de CD-P, se indica la posición inicial y final de la secuencia, tomando como +1 el sitio de inicio de la transcripción. Los oligonucleótidos PEA y mPEA contenían adaptadores HindIII y BamHI en los extremos 5' y 3', respectivamente (no mostrado en la secuencia). El resto de oligonucleótidos, salvo ECE y sus derivados mutados, contenían adaptadores BamHI en los extremos (GATCC en 5' y G en 3').

Oligonucleótidos del promotor de CD-E:

Posición

E-pal	GGCTGCCACCTGCAGGTGCGTCC	-92/-69
E-pal mut	GGCTGCCACCTTTAGGTGCGTCC	"
CCAAT-E	CGTCCCCAGCCAATCAGCG	-74/-56
GC-E	CAGCGGCGCCGGGGGCGGTGCCTGCGGGCTCACCTGGC	-60/-23
ECE	GAGGGCCCTGCAGTTCCTTGGCTGCCACC	-111/-83
mA	GAGGGCCCTGCAGTTAATTGGCTGCCACC	"
mB	GAGGGCAATGCAGTTCCTTGGCTGCCACC	"
mAB	GAGGGCAATGCAGTTAATTGGCTGCCACC	"
mC	GAGGGCCCTGCTGTTTCCTTGGCTGCCACC	"

Oligonucleótidos del promotor de CD-P:

Posición

CCAAT-P	GTTGGACCAATCAGCAGC	-70/-53
GC-P	TCGACCCACCTGCGAGGGGGCGGGACC	-105/-78
SP1-P	CGAGGGGGCGGGACCTTG	-92/-75
AP2-P	GCCTCGACCCACCTGCG	-108/-90

Oligonucleótidos con sitios consenso de unión a factores de transcripción:

CP-1	CTACACCTATAAACCAATCAC	(Chodosh <i>et al.</i> , 1988)
CP-2	TGACCAGTTCCAGCCACT CTT	(Chodosh <i>et al.</i> , 1988)
C/EBP	TTCAATTGGGCAATCAGGA	(Ryden y Beemon, 1989)
NF1	ATTTTGGCTACAAGCCAATATGAT	(Courtois <i>et al.</i> , 1990)
SP1-SV40	TGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACT	(Kadonaga <i>et al.</i> , 1987)
AP2-SV40	AAAGTCCCCAGGCTCCCCA	(Imagawa <i>et al.</i> , 1987)
PEA 3	TTAAGCAGGAAGTGACTAACTGA	(Wasylyk <i>et al.</i> , 1990)
mPEA 3	TTAAGCATTAAGTGACTAACTGA	mutación del sitio PEA3

Fragmentos de CD-E:

Los fragmentos A, B, C y D de la región 5' del gen de CD-E se obtuvieron por digestión del plásmido -178 o -58 y purificación del fragmento deseado en gel de agarosa o acrilamida. Se indican a continuación las enzimas empleadas y las posiciones correspondientes del promotor de CD-E.

- Fragmento A: digestión con XbaI del plásmido -178, abarca las posiciones -178/+92.
- Fragmento B: digestión con XbaI/ApaI del plásmido -178, abarca las posiciones -178/-109.

- Fragmento C: digestión con *Apal/NotI* del plásmido -178, abarca las posiciones -109/-24.
- Fragmento D: digestión con *XbaI* del plásmido -58, abarca las posiciones -58/+92.

9.3. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de footprinting *in vivo*.

A continuación se describen los oligonucleótidos empleados en los experimentos de footprinting *in vivo*, escritos en dirección 5'-3'. Para amplificar y marcar la cadena codificante del promotor de CD-E se emplearon los oligonucleótidos U1, U2 y U3 (Hennig, G. *et al.*, 1995), y para la cadena no codificante se emplearon los oligonucleótidos L1, L2 y L3. Los oligonucleótidos "largo" y "corto" (Mueller y Wold, 1989) se hibridaron para generar el adaptador, de cadena doble.

		Posición
U1	5'-ACG CCG AGC AAA CAC TGA G-3'	+113/+95
U2	5'-GGG CAG GAG TCT AGC AGA AGT TCT T-3'	+61/+37
U3	5'-AAG TTC TTG GGA ACT CAG TAG TGC GCC G-3'	+44/+17
L1	5'-AAG TCC TTT GTA ACT CCA TGT-3'	-247/-227
L2	5'-ACT CCA TGT CTC CGT GGG TCA GA-3'	-235/-213
L3	5'-CCA TGT CTC CGT GGG TCA GAG CAC AGC TAG GCT-3'	-232/-200
Largo	5' HO-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C-OH 3'	
Corto	5' HO-GAA TTC AGA TC-OH 3'	

1. CULTIVO CELULAR.

Todas las líneas celulares se crecieron en medio Ham's F12, salvo las líneas NIH3T3 y MSC11A5 que se crecieron en medio DMEM. Los medios de cultivo se suplementaron con 2mM glutamina y 10% suero fetal bovino. Asimismo, se adicionó a los medios de cultivo ampicilina (100 µg/ml), gentamicina (32 µg/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml).

Todas las células se crecieron en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

2. OBTENCIÓN DE TRANSFECTANTES ESTABLES.

La línea celular E24, que expresa el gen endógeno de CD-E, se transfectó con el vector de expresión antisentido de CD-E pβact-dacE por el método del fosfato cálcico para células adherentes (Sambrook *et al.*, 1989).

Se crecieron las células a subconfluencia en placas de 6 cm de diámetro y se sustituyó el medio de crecimiento por medio DMEM-10% suero 4 h antes de la transfección. Las células se transfectaron con 5 µg del plásmido pβact-dacE, 0.5 µg del vector de resistencia a puromicina pBSpacΔP y 10 µg de timo de ternera como "carrier". Asimismo, se realizó en paralelo una transfección control sobre E24, en idénticas condiciones pero sólo con el vector de resistencia al antibiótico. El DNA a transfectar se precipitó en solución HBS 1x, 125 mM CaCl₂. Una vez formado el precipitado, se agregó a las placas de cultivo y se mantuvo durante 18 h, tras las cuales se lavó el medio con el DNA y se sustituyó por medio de crecimiento Ham's F12 10% suero. Las células se dejaron crecer durante 24 h hasta llegar a confluencia, tras lo cual se inició la selección de los transfectantes estables con el antibiótico puromicina (1.5 µg/ml) hasta la obtención de clones aislados de células resistentes. Las colonias resistentes se subclonaron y se analizó la expresión de CD-E por inmunofluorescencia e inmunoblot. Los diferentes clones se crecieron en presencia del antibiótico de selección durante al menos 10 pases.

3. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

3.1. Inmunofluorescencia.

Las células se crecieron en cubreobjetos de cristal de 10 mm de diámetro hasta alcanzar la confluencia. Se lavaron 2 veces en HMF-Ca²⁺ y se fijaron y permeabilizaron con metanol frío (-20°C) durante 4 minutos. Los cristales se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios 1 h en cámara húmeda a 37°C a la dilución correspondiente conteniendo 0.1% BSA. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda, también con 0.1% BSA. Tras las incubaciones con cada uno de los anticuerpos, los cristales se lavaron con PBS 4 veces durante 10 minutos a

temperatura ambiente y en agitación. Finalmente se lavaron con agua destilada y se montaron sobre portaobjetos con mowiol (Harlow y Lane, 1988). Las preparaciones se observaron en un fotomicroscopio Axiophot (Zeiss) equipado con epifluorescencia.

3.2. Obtención de extractos celulares para inmunoblot.

a) Extractos para inmunodetección de CD-E, CD-P e involucrina.

Las células se crecieron en placas de 10 cm de diámetro a confluencia y se lavaron 2 veces con HMF-Ca²⁺. Se añadió 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 1% NP-40, 1% Tritón X-100) con inhibidores de proteasas (2 mM PMSF y 20 µg/ml de aprotinina) y se extrajeron las proteínas durante 20-25 minutos a 4°C. Se rasparon las células, se recogieron y se centrifugaron en frío durante 15 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se procesó inmediatamente o bien se guardó a -70°C.

b) Extractos para inmunodetección de Ets.

Las células se crecieron de igual forma, se lavaron con PBS y se les añadió 1 ml de solución RIPA fría (1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% Na-deoxicolato en PBS) conteniendo inhibidores de proteasas (1mM PMSF y 60 µg/ml de aprotinina) e inhibidores de fosfatasa (1mM Na-ortovanadato). Las células se recogieron, se pasaron por agujas 20Gx1 in, y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Posteriormente se centrifugaron en frío para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se procesó inmediatamente o se guardó a -70°C.

3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunoblot.

Muestras con idéntica cantidad de proteína (35 µg, excepto en el caso de extractos para detección de Ets, que fué 10 µg) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10% (detección de Ets) o al 7.5% (resto de anticuerpos), tal como describió Laemmli (1970). Las proteínas contenidas en los geles de poliacrilamida se transfirieron electroforéticamente a membranas de Immobilon-P (Millipore) a 3 mA/cm² durante 45 minutos en aparato de transferencia semiseco en Tris-glicina 1x, 20% metanol. Las membranas se tiñeron con 0.1% Rojo Ponceau en 1% ácido acético para comprobar la eficiencia de la transferencia y se destiñeron con 1% ácido acético.

Posteriormente las membranas se incubaron con solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente o 16 h a 4 °C, se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente o 16 h a 4°C, se lavaron con solución de lavado 4 veces durante 15 minutos, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, se volvieron a lavar, y se revelaron.

En el caso de detección de CD-E y de CD-P el bloqueo se hizo en 2% ovoalbúmina en NET y los lavados e incubaciones en NET. El anticuerpo secundario anti-rata empleado para detección de CD-E estaba acoplado a la enzima peroxidasa y el revelado se realizó por luminiscencia con el reactivo ECL (Amersham). En el caso de CD-P se empleó ¹²⁵I-anti-Ig de rata y se detectó por exposición a película autorradiográfica.

La solución de bloqueo para detección de involucrina fué 2% leche desnatada (Central Lechera Asturiana) en T-TBS y los lavados e incubaciones se realizaron en T-TBS. El anticuerpo secundario anti-conejo estaba acoplado a fosfatasa alcalina y el revelado se realizó con los reactivos BCIP y NBT.

Para inmunodetección de Ets se empleó como solución de bloqueo 5% leche desnatada en T-TBS. Las incubaciones se realizaron en T-TBS, 0.4% BSA y los lavados en T-TBS. El anticuerpo secundario anti-conejo estaba acoplado a peroxidasa. El revelado se realizó por luminiscencia con el reactivo ECL (Amersham).

4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN *IN VITRO* EN GELES DE COLÁGENO.

La capacidad migratoria de las células a través de geles de colágeno se midió utilizando la cámara Boyden de dos compartimentos modificada. Se recubrieron filtros de policarbonato de 8 μm de diámetro de poro (Nucleopore) con 5 μg por filtro de colágeno tipo IV durante 16 h y se colocaron en la cámara modificada de Boyden. Se rellenó el compartimento inferior con medio condicionado de fibroblastos NIH3T3 (que actúa como quimioatrayente) o con 0.1% BSA como control negativo. El medio condicionado se obtuvo por incubación de cultivos semiconfluentes de NIH3T3 con medio sin suero durante 48 h. Posteriormente se sembraron 2×10^6 células resuspendidas en medio completo con 0.1% BSA en el compartimento superior de la cámara, sobre el filtro recubierto de colágeno. Las cámaras se colocaron en un incubador a 37°C, 5% CO₂, durante 6 h. Finalmente las células del compartimento inferior, y las células adheridas a la parte inferior de los filtros se recogieron y contaron. Los ensayos se efectuaron con las células creciendo a alta densidad. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

5. ENSAYOS DEL COMPORTAMIENTO *IN VIVO* DE LOS CLONES TRANSFECTANTES.

5.1. Ensayos de tumorigenicidad.

Para los ensayos de tumorigenicidad de las distintas líneas celulares éstas se inyectaron subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (nu/nu) entre 8 y 10 semanas de edad. Las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS a una densidad de 10^7 células/ml. Se inyectaron 10^6 células en cada costado del ratón.

Tras la inyección se observaron los ratones hasta detectar la aparición de tumores, considerándose como tiempo de latencia el tiempo que tardó en desarrollar un tumor detectable de 0.5 cm³ de volumen. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño entre 1.5 y 2 cm de diámetro los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores para su posterior análisis.

5.2. Ensayos de metástasis espontánea.

Las células en cultivo se tripsinizaron con 0.25% tripsina, 0.02% EDTA, se lavaron con medio de cultivo y se resuspendieron en HBSS (Gibco BRL) a una concentración de 5×10^6 células/ml. Se inocularon intradérmicamente 0.2 ml de esta suspensión en un costado del ratón. Cuando el tamaño de los tumores generados alcanzó 1.2 cm de diámetro, los ratones se anestesiaron, se extirparon los tumores y se cerraron las incisiones con puntos. Los ratones se sacrificaron y examinaron cuando estaban moribundos o hasta 60 días después de extirpar el tumor primario. Se investigó la existencia de tumores en todos los órganos viscerales, siguiendo criterios morfológicos e histológicos. Los pulmones se extirparon, se fijaron y se examinó la presencia de metástasis.

6. DETECCIÓN DE PROTEASAS POR ZIMOGRAFÍA.

6.1. Detección de la actividad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).

- Obtención de células y medio condicionado.

Se crecieron las células hasta un 90% de confluencia, se lavaron con PBS y se sustituyó el medio normal de crecimiento por medio sin suero. Se condicionó este medio durante 24 h, tras las cuales se recogió el medio condicionado y las células, raspándolas en PBS. La concentración de proteína se cuantificó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

- Detección de uPA por difusión reversa.

Las muestras (medio condicionado o extracto total) se resuspendieron en solución Laemmli de carga sin β -mercaptoetanol y se sometieron a electroforesis en geles de 10% poliacrilamida-SDS. El SDS se eliminó por lavados (2 x 30 minutos) en 1.5% Triton X-100. Tras lavar con agua destilada se superpuso el gel sobre otro gel de agarosa al 1% conteniendo 0.5% caseína, 2 μ g/ml plasminógeno, 20 mM CaCl_2 , o bien, como control, el mismo gel sin plasminógeno.

Los geles se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda hasta la visualización de bandas transparentes de degradación de la caseína por el plasminógeno activado por el uPA. La reacción se paró con 5% CuCl_2 .

6.2. Detección de actividad gelatinolítica.

- Obtención de medio condicionado.

Las células crecidas a 90% de densidad se incubaron con medio sin suero durante 24 h. Este medio condicionado se centrifugó para eliminar sedimentos (3500 g, 15 minutos a 4°C) y se concentró en microconcentradores Centricon-30. La concentración de proteína se midió por por BCA (Bio-Rad).

- Zimografía para detección de la actividad gelatinolítica del medio condicionado.

La detección de actividad gelatinasa en el medio condicionado de los cultivos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Welch *et al.* (1990). El medio condicionado de cada línea correspondiente a 12 µg de proteína se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS embebidos en gelatina. Posteriormente se eliminó el SDS del gel mediante lavados en 2.5% Tritón X100, 50mM Tris-HCl pH 7.5. Los geles se incubaron durante 48 h a 37°C en 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, NaN₃ 0.05%. Se tiñó el gel con azul de Coomassie durante 3 h y se destiñó con 10% ácido acético, 10% isopropanol. La actividad gelatinasa se detectó como bandas transparentes sobre el fondo azul del gel.

7. ANÁLISIS DE RNA POR TRANSFERENCIA A MEMBRANA (NORTHERN-BLOT).

7.1. Obtención de RNA.

Para analizar los niveles de RNA mensajero de CD-E y de CD-P se aisló RNA total de las distintas líneas celulares por el método del tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Para analizar la expresión de las diferentes metaloproteinasas se aisló mRNA poli-A⁺, empleando el kit de aislamiento de mRNA "Ribosept" (Collaborative Biomedical Products).

7.2. Purificación y marcaje de sondas.

Cada uno de las sondas obtenidas por digestión de plásmidos se purificó por el sistema "GeneClean" (Bio 101 Inc.) o columnas "Quiakit" (Quiagen) a partir de geles de agarosa.

El marcaje con ³²P-αdCTP (Amersham) de las distintas sondas se realizó por el método del cebado de los oligonucleótidos al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

7.3. Ensayo de Northern-blot.

30 µg de RNA total o 15 µg de RNA poli-A⁺ se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% con tampón formaldehído-fosfato (Rave *et al.*, 1979) y se transfirieron al vacío (5 in. Hg, 2 h) a membranas de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) en tampón 10x SSC. El RNA se fijó a la membrana con luz UV (aparato UV 2400 Stratalinker, Stratagene).

Las membranas se hibridaron durante 2 h a 65°C con tampón de prehibridación (4x SSC, 5 mM EDTA, 2% SDS, 10x solución Denhardt, 20 mM H₂NaPO₄ pH 7.0, y 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado) y posteriormente con las sondas apropiadas marcadas con ³²P en tampón de prehibridación durante 16-20 h a 65°C. Las membranas se lavaron con 2xSSC, 0.1% SDS durante 10 minutos a temperatura ambiente y

2 veces durante 30 minutos a 65°C. Finalmente se lavaron con 0.1xSSC, 0.1% SDS 20 minutos a 65°C. Las membranas se expusieron a -70°C con película autorradiográfica empleando pantallas amplificadoras.

8. ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA.

8.1. Transfección transitoria.

Las transfecciones transitorias se realizaron por el método de precipitación con fosfato cálcico para células adherentes siguiendo el protocolo descrito para las transfecciones estables (Aptdo. 2). En general se empleó 5 µg de plásmido de interés y 2 µg de plásmido control de eficiencia de transfección. A las 16 h se lavó el DNA con PBS y se añadió medio de crecimiento. Las células se recogieron transcurridas 24 h, a confluencia, para medir actividad CAT, luciferasa, o β-galactosidasa.

8.2. Preparación de extractos celulares.

Las células transfectadas y a confluencia se recogieron y lavaron varias veces con PBS 1x frío. Tras la última centrifugación se resuspendieron en tampón de lisis (0.1 M KH_2PO_4 pH7.8) y se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se empleó directamente para medida de actividad enzimática o se congeló a -20°C.

8.3. Ensayos CAT.

La actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT), como medida de actividad del promotor de CD-E, se determinó en cantidades de extracto celular normalizadas según la actividad luciferasa. El extracto celular se incubó a 37°C durante 4-8 h con 0.1 µCi de [^{14}C]-cloranfenicol (54mCi/mmol, DuPont) y acetilcoenzima A 4 mM en presencia de Tris-HCl 250 mM pH 7.8, EDTA 5mM (Gorman *et al.*, 1982). La reacción se paró con 1 ml de acetato de etilo, se separaron las fases orgánicas y acuosas por centrifugación, y se recogió la fase orgánica, que contenía el [^{14}C]-cloranfenicol. Las formas acetiladas y no acetiladas de [^{14}C]-cloranfenicol se separaron mediante cromatografía en capa fina en placas de silicagel (Merck), utilizando como solvente una mezcla de cloroformo y metanol (92.5:7.5).

El porcentaje de acetilación se determinó mediante la cuantificación de la radiactividad presente en cada una de las formas acetiladas y no acetiladas, con la ayuda de un equipo Instant-Imager (Hewlett-Packard) o mediante la cuantificación de las bandas cortadas utilizando un contador de centelleo.

8.4. Medida de actividad luciferasa.

En los experimentos de análisis de actividad del promotor de CD-E, se midió la actividad de CMV-luc como control de eficiencia de transfección. En cada experimento se emplearon volúmenes iguales de extracto celular de cada muestra.

En los experimentos de análisis de actividad transcripcional dirigida por el promotor de CD-P o construcciones híbridas CD-E/CD-P acopladas al gen de luciferasa, las cantidades de extracto celular empleadas para medir actividad luciferasa se normalizaron respecto a la actividad β -galactosidasa.

La actividad luciferasa se valoró siguiendo las indicaciones del sistema de ensayo de luciferasa de Promega, empleando luciferina como sustrato, en un luminómetro Berthold-BioLumat.

8.5. Medida de actividad β -galactosidasa.

La medida de actividad β -galactosidasa se empleó como control de eficiencia de transfección en los experimentos de análisis de actividad promotora de CD-P y de promotores híbridos CD-E/CD-P. Se midió la actividad en volúmenes iguales de extracto celular, en cada experimento, según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

9. ENSAYOS DE CAMBIO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL.

9.1. Obtención de extractos nucleares.

Los extractos nucleares se obtuvieron según el protocolo descrito por Shapiro (1988) para células HeLa. La concentración de proteína se midió con el reactivo de Bradford (Bio-Rad), y los extractos se conservaron a -70°C en alícuotas pequeñas.

9.2. Ensayos de retardo en gel.

El oligonucleótido o fragmento, de cadena doble y con extremos 5' protuberantes, se marcó por incubación con la enzima Klenow, los deoxinucleótidos apropiados y ^{32}P - αdCTP (Amersham).

2-10 μg de extractos nucleares se incubaron con 10.000 cpm de la sonda marcada (aprox. 0.2 ng) en tampón de retardo en gel (60mM KCl, 2mM MgCl_2 , 10% glicerol, 0.1-5mM EDTA, 1mM DTT, 20 mM Hepes pH7.9), en un volumen final de 10-15 μl . Cuando la presencia de zinc era necesaria para la formación de los complejos, se incluía en la mezcla de incubación 1-4 mM de Zn_2SO_4 . Como competidor inespecífico se incluyó 1 μg de poli(dI-dC), y en ocasiones también 90 μg de BSA. Las incubaciones se realizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, salvo en el caso del oligonucleótido ECE, que fueron durante 30 minutos a 0°C .

Los complejos DNA-proteína formados se analizaron en geles de poliacrilamida al 5% en TBE 0.5x. Posteriormente los geles se secaron (80°C a vacío) y se expusieron a películas autorradiográficas a -70°C.

9.3. Ensayos de competición.

En los experimentos de competición se añadió a la mezcla de incubación un exceso (40 a 250 veces) del oligonucleótido frío empleado en cada caso, previo a la adición del oligonucleótido marcado.

9.4. Ensayos de super-retardo.

Aproximadamente 1.5 µg de anticuerpo de conejo policlonal anti-AP2 o anti-SP1 (Santa Cruz Biotechnology) o de IgG de conejo purificada se añadió a la mezcla de incubación, después de la adición del oligonucleótido marcado y de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo se realizó a temperatura ambiente durante otros 20 minutos adicionales.

10. EXPERIMENTOS DE PROTECCIÓN A DNAasaI O DE FOOTPRINTING *IN VITRO*.

10.1. Proteínas purificadas y extractos nucleares.

Los extractos nucleares se obtuvieron de igual forma que para los ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel.

Los factores de transcripción recombinantes humanos purificados SP1 y AP2 se obtuvieron de Promega.

10.2. Obtención y marcaje de la sonda.

Se empleó como sonda un fragmento de la región promotora de CD-E que comprendía la secuencia entre -178 y +17, marcado en el extremo 3' de la cadena no codificante.

El plásmido -178 (ver Materiales, Apto. 8.2.1) se digirió con la enzima de restricción XbaI y se marcó en los extremos generados por incubación con la enzima Klenow, los deoxinucleótidos apropiados y ³²P-αdCTP. Tras la posterior digestión con el enzima de restricción KspI (que corta en la posición +17 del promotor) los fragmentos originados se separaron en gel de acrilamida al 5%. Los fragmentos marcados se visualizaron por exposición del gel a película autorradiográfica y se recortó la banda de poliacrilamida que contenía el fragmento deseado. El DNA así marcado se eluyó del fragmento de gel y se purificó en columnas NACS PREPAC (Gibco, BRL).

10.3. Secuenciación química por Maxam-Gilbert.

Para las reacciones control de secuencia se empleó el kit de secuenciación de Maxam-Gilbert (Merck). Se emplearon 100.000 cpm (reacciones de G) o 250.000 cpm (reacciones de A+G) de la sonda marcada.

10.4. Digestión con DNAasaI y separación de los fragmentos en gel.

La reacción de digestión con DNAasaI se realizó como se describe en Hennighausen y Lubon (1987). Alrededor de 50 µg de extractos nucleares o 1 fpu de los factores puros SP1 o AP2 se incubaron con 15.000 cpm (alrededor de 1-2 ng) de la sonda marcada en presencia de 1 µg de poli(dI-dC) en tampón de equilibrado (50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glicerol, 20 mM Hepes-KOH pH7.5) en un volumen de 50 µl. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió MgCl₂ y CaCl₂ a una concentración final de 5mM y 1 mM, respectivamente, tras lo cual se añadió a la mezcla de incubación de 60 a 100 ng de la enzima DNAasa I. A los 30 segundos se paró la reacción de digestión con solución de parada (0.37% SDS, 15 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH7.6).

Las reacciones control se realizaron de igual forma pero en ausencia de extracto nuclear o proteína purificada y en ausencia también del competidor inespecífico poli(dI-dC). La cantidad de DNAasa I empleada en este caso fué alrededor de 10 ng.

Los fragmentos generados por la digestión con DNAasa I y por la secuenciación química de Maxam-Gilbert se separaron en geles de secuenciación (8% acrilamida, 8M urea en TBE 1x). Los geles se secaron a 80°C a vacío y se expusieron a película autorradiográfica a -70°C.

11. ANÁLISIS DEL ESTADO DE METILACIÓN ENDÓGENA DEL DNA.

11.1 Obtención de DNA genómico.

El DNA se obtuvo a partir de las células en cultivo según métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989).

11.2. Purificación y marcaje de la sonda.

Un fragmento correspondiente a las posiciones -800/+92 del promotor de CD-E obtenido por digestión del plásmido -800 (ver Materiales, Apto. 8.2.1) con XbaI se aisló a partir de gel de agarosa y se marcó con ³²P-αdCTP (Amersham) por el método del cebado de los oligonucleótidos al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

11.3. Digestión del DNA y ensayo de Southern-blot.

El DNA de cada una de las líneas celulares a analizar se sometió a digestión con el enzima de restricción BamHI (15 U/ µg de DNA). Alícuotas de 10 µg de DNA se sometieron a una segunda digestión con 15 U/ µg de las enzimas de restricción HaeII (sensible a

metilación), HpaII (sensible a metilación), o MspI (isoesquizómero de HpaII, no sensible a metilación).

El DNA se fraccionó en geles de agarosa al 1% (digestiones control y HaeII) o al 1.2% (digestiones con HpaII y MspI), se transfirió al vacío (5 in. Hg, 2 h) a membranas de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) en tampón 10x SSC y se fijó el DNA a las membranas con luz UV (aparato UV 2400 Stratalinker, Stratagene).

Las membranas se hibridaron durante 2 h a 65°C con tampón de prehibridación (6x SSC, 0.5% SDS, 5x solución Denhardt, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado) y posteriormente con la sonda marcada con ³²P en tampón de hibridación (igual composición que el tampón de prehibridación excepto 2x solución Denhardt) durante 16-20 h a 65°C. Las membranas se lavaron comenzando con 2x SSC-0.5% SDS a temperatura ambiente y terminando con 0.1x SSC- 0.5% SDS a 65°C. Las membranas se expusieron a -70°C con película autorradiográfica empleando pantallas amplificadoras.

12. EXPERIMENTOS DE FOOTPRINTING *IN VIVO* .

12.1. Metilación y obtención del DNA.

Las células, crecidas en placas de 15 cm de diámetro y a confluencia, se sometieron a metilación *in vivo* por tratamiento con el agente metilante dimetilsulfato (DMS). Se retiró el medio de crecimiento y se sustituyó por medio de crecimiento conteniendo 0.5% DMS (tamponado con Hepes-KOH pH 7.5) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron posteriormente con PBS frío, se recogieron, y se extrajo el DNA por procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la obtención del DNA control, metilado *in vitro*, 20 µg de DNA genómico de las líneas celulares se trataron durante 1 minuto a temperatura ambiente con 0.5% DMS en 200 µl de solución 1mM EDTA, 50 mM Na-cacodilato. La reacción de metilación se paró con 50 µl de solución de parada (1.5M Na acetato, 1M β-mercaptoetanol).

12.2. Digestión con piperidina.

Tanto el DNA metilado *in vivo* como el DNA control metilado *in vitro* se sometieron a digestión química en los residuos metilados con el agente piperidina. El DNA se resuspendió en 100 µl de piperidina al 10% y se digirió durante 30 minutos a 90°C.

12.3. Amplificación por PCR mediada por adaptador.

A continuación la escalera de DNA generada por digestión con piperidina se amplificó específicamente en la región 5' proximal del gen de CD-E y se marcó con ³²P, según el protocolo descrito en Mueller y Wold (1989). Todos los oligonucleótidos empleados en estos experimentos se describen en Métodos (Aptdo 9.3). En la Fig. 7 se muestra una representación esquemática de las reacciones llevadas a cabo:

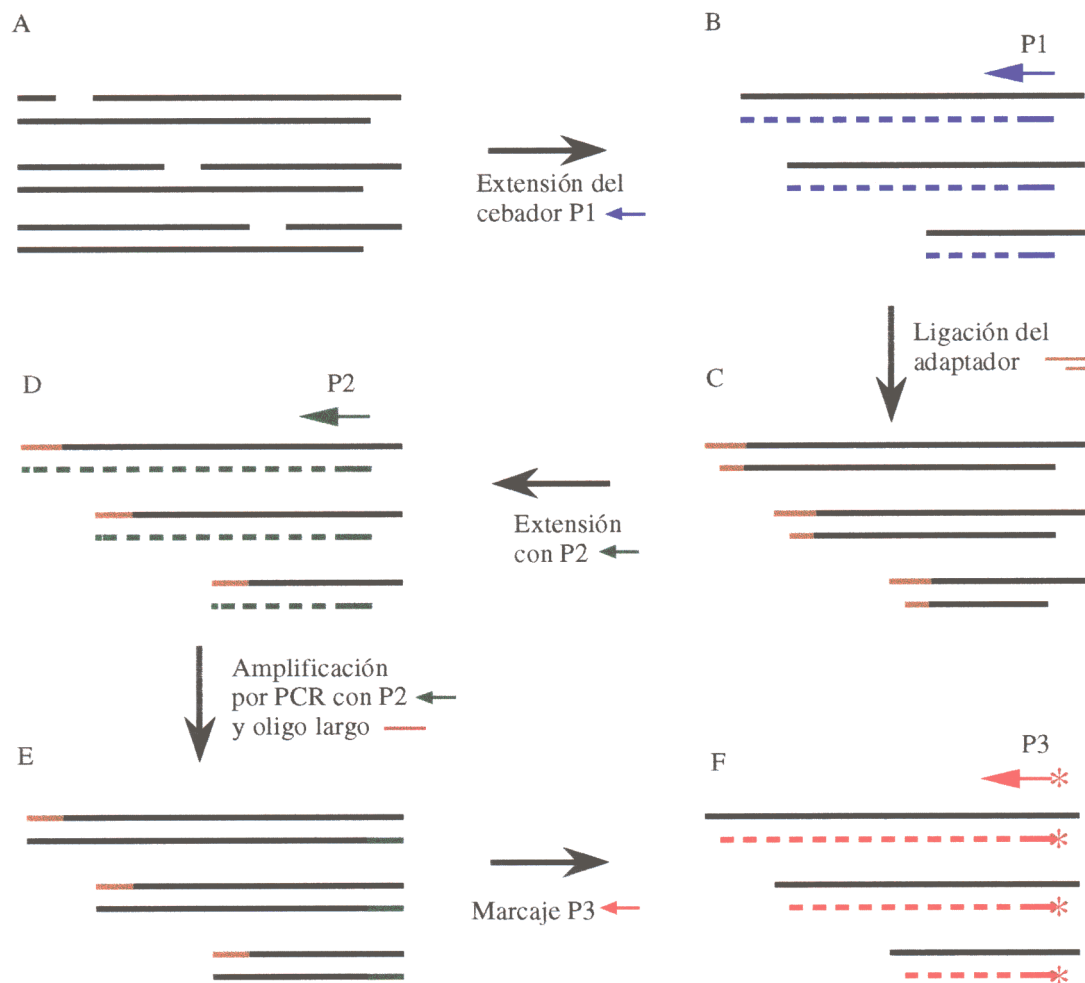


Figura 7. Representación esquemática de los experimentos de footprinting *in vivo* por amplificación mediada por adaptador. El DNA genómico metilado con DMS *in vivo* o *in vitro* y cortado con piperidina, sirve como punto de partida (A) para la reacción de extensión del cebador con el oligonucleótido P1, específico del gen a estudiar. Así se genera DNA de doble cadena con un extremo romo (B). Después se añade una secuencia definida de DNA a los extremos variables mediante ligación del adaptador común a los extremos romos de las moléculas de DNA (C). La posterior extensión con el cebador P2, más interno a P1, aumenta la especificidad y genera DNA con extremos definidos (D) apropiados para amplificación por PCR con los cebadores P2 y el oligonucleótido largo del adaptador. Se genera así una población de fragmentos de DNA de tamaño variable según el residuo de guanina metilado y cortado con piperidina (E). Estos fragmentos de DNA se marcan por extensión con el oligonucleótido P3 marcado radioactivamente (F) y se separan en gel de secuenciación.

a) Extensión del cebador.

3 µg de DNA digerido con piperidina se sometieron a la reacción de extensión del cebador empleando los oligonucleótidos P1 (U1 o L1 para la cadena codificante o no codificante, respectivamente). La reacción se llevó a cabo incubando el DNA con 0.6 pmoles del oligonucleótido cebador durante 30 minutos a 45°C, tras lo cual se añadieron los deoxinucleótidos (dNTPs) y enzima Sequenasa (Sequenasa versión 2, USB) y se incubó durante 15 minutos a 45°C. La reacción se paró en hielo y la Sequenasa se inactivó por calor (67°C).

b) Reacción de ligación del adaptador.

A la mezcla de reacción anterior se añadió el adaptador (ver Materiales, Apto. 9.3), ATP y la enzima T4 DNA ligasa. Se incubó durante 16 h a 15°C y se paró la reacción a 70°C durante 10 minutos.

c) Amplificación por PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un aparato Perkin-Elmer 2400. Se emplearon como cebadores el oligonucleótido P2 (U2 o L2 según se trate de la cadena codificante o no codificante) y el oligonucleótido largo del adaptador. Se preparó una mezcla de reacción con el DNA, los oligonucleótidos cebadores, dNTPs y la enzima Taq polimerasa. Las condiciones de la reacción de PCR fueron:

Cadena codificante: 30 ciclos (1 minuto 94°C, 2 minutos 65°C, 3 minutos 76°C).

Cadena no codificante: 20 ciclos (1 minuto 94°C, 1 minuto 45°C, 3 minutos 72°C).

d) Marcaje.

Los oligonucleótidos P3 (U3 y L3) se marcaron en el extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido kinasa y ^{32}P -γATP.

El DNA se marcó mediante un último ciclo de PCR (2 minutos 94°C, 2 minutos 65.5°C, 10 minutos 72°C) tras agregar 2 pmoles del oligonucleótido P3 marcado con ^{32}P , nueva enzima Taq polimerasa y dNTPs.

12.4. Separación en gel y visualización.

Los productos de las reacciones de la amplificación por PCR mediada por adaptador se separaron en geles de secuenciación (8% acrilamida, 8M urea en TBE 1x). Los geles se secaron y se expusieron a película autorradiográfica -70°C.

RESULTADOS

1. PAPEL DE LA CADHERINA-E EN EL COMPORTAMIENTO MALIGNO DE QUERATINOCITOS TUMORALES DE RATÓN.

Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto el papel de la molécula de adhesión CD-E como molécula anti-invasiva. En concreto, en queratinocitos transformados de ratón, y empleando el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, estudios previos pusieron de manifiesto una relación inversa entre la CD-E y la capacidad invasiva (Caulín *et al.*, 1996), como se ha indicado en la Introducción. En este estudio, en el que se analizaron los mecanismos moleculares que inducen un comportamiento invasivo y metastásico, se analizó la línea celular HaCa4 y una serie de líneas originadas por transfección de HaCa4 con el cDNA de CD-E (Navarro *et al.*, 1991; ver también Tabla II y Fig. 5). Así, se pudo comprobar que tanto la capacidad tumorigénica como la capacidad invasiva *in vitro* estaban relacionadas con la ausencia de CD-E en las líneas celulares estudiadas (Tabla III). También se analizó la capacidad metastásica de dichas líneas celulares, y en este caso no se encontró una relación clara con la CD-E, ya que algunas de las líneas celulares que expresaban dicha molécula por transfección, como E62, seguían mostrando un comportamiento metastásico; mientras que la línea celular E24, que había reactivado por mecanismos desconocidos la expresión de CD-E endógena, era no metastásica.

Tabla III. Características de las líneas celulares empleadas en los estudios de funcionalidad de CD-E.

Línea celular	Niveles de CD-E ⁽¹⁾	Niveles de v-Ha-ras ⁽²⁾	Migración <i>in vitro</i> ⁽³⁾	Capacidad metastásica ⁽⁴⁾
HaCa4	-	+++	+	+
Neo3	-	+++	+	+
E58	-	+++	+	+
E62	++	+++	-	+
E24	+/++	+	-	-
MCA3D	++	-	-	-

(1) Los niveles relativos de CD-E se estimaron a partir de datos de Northern-blot e inmunoblot (Navarro *et al.*, 1991; ver también Fig. 8).

(2) Los niveles de v-Ha-ras se estimaron a partir de datos de Northern-blot e inmunoprecipitación con anti-p21 ras (Caulín *et al.*, 1996).

(3) Capacidad migratoria a través de geles de colágeno (Caulín *et al.*, 1996; ver Métodos).

(4) La capacidad metastásica se estimó analizando la metástasis espontánea (inyección intradérmica en ratones nu/nu y extirpación del tumor primario) y la metástasis experimental (inyección de las células en la vena de la cola del ratón). Se determinaron las metástasis pulmonares (Caulín *et al.*, 1996).

Como se muestra en la figura 8A, el tamaño del mensajero transfectado (3.9 Kb, líneas celulares E62 y E54) era sensiblemente menor al endógeno (4.5 Kb). Sin embargo, el tamaño de proteína de CD-E sintetizada era el mismo (124 KDa, Fig 8C) y la CD-E exógena era funcional y se asociaba con cateninas, de igual forma que la CD-E endógena (Caulín *et al.*, 1996).

Debido al origen de la línea HaCa4 (ver Materiales, Apto.4), estas líneas tienen integrado en su genoma secuencias de Ha-ras viral (v-Ha-ras). El análisis en estas líneas de los niveles de Ha-ras mostró que la línea celular E24 presentaba niveles mucho menores de mRNA de v-Ha-ras y de proteína p21 ras que el resto de líneas celulares. Por tanto, en este sistema, el comportamiento metastásico podría estar relacionado con los niveles de Ha-ras, más que con la expresión de CD-E (Caulín *et al.*, 1996).

Nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos de invasividad y metástasis, y en concreto caracterizar mejor los mecanismos que hacen que la línea celular E24 sea menos agresiva y presente un fenotipo no metastásico. Nos interesaba también estudiar el posible papel que la CD-E pudiera tener en este comportamiento, puesto que, aunque la CD-E exógena transfectada en la línea metastásica E62 era funcional, no se podía descartar alguna característica diferencial con la CD-E endógena de la línea E24.

El abordaje experimental para conseguir este objetivo fué bloquear la CD-E endógena de la línea E24 por transfección de un cDNA antisentido de CD-E y analizar el fenotipo y comportamiento tumoral y metastásico de los transfectantes obtenidos.

1.1. Generación de transfectantes de la línea celular E24 con un vector de CD-E antisentido.

El vector antisentido para CD-E p β act-dacE se construyó a partir de los vectores pBATEM-2 y p β act-Pcad (Nose *et al.*, 1988), vectores de expresión de CD-E y de CD-P de ratón, respectivamente. Se aisló un fragmento de 2.5 Kb del cDNA de CD-E de ratón (nucleótidos 640 a 3170), por digestión de pBATEM-2 con EcoRI. Dicho inserto se clonó en posición antisentido en el vector de expresión p β act-Pcad, tras eliminar el fragmento correspondiente al cDNA de CD-P por digestión con EcoRI, originando así el vector p β act-dacE (Fig. 9). Por cortes con enzimas de restricción adecuadas (SmaI) y secuenciación del vector se comprobó la correcta orientación (inversa) del cDNA de CD-E. Por tanto, el vector p β act-dacE contiene un fragmento de 2529 nucleótidos (exones 4 a 16) del cDNA de CD-E de ratón en dirección inversa, situado detrás del promotor de β -actina.

Se transfectó la línea celular E24 (CD-E positiva) por el método del fosfato cálcico con el vector p β act-dacE y el vector de resistencia a puomicina pBSpac Δ P (clones antisentido) o el vector de resistencia a puomicina solo (clones control) (Fig. 10). Se seleccionaron los clones resistentes a puomicina y se analizó inicialmente la expresión de

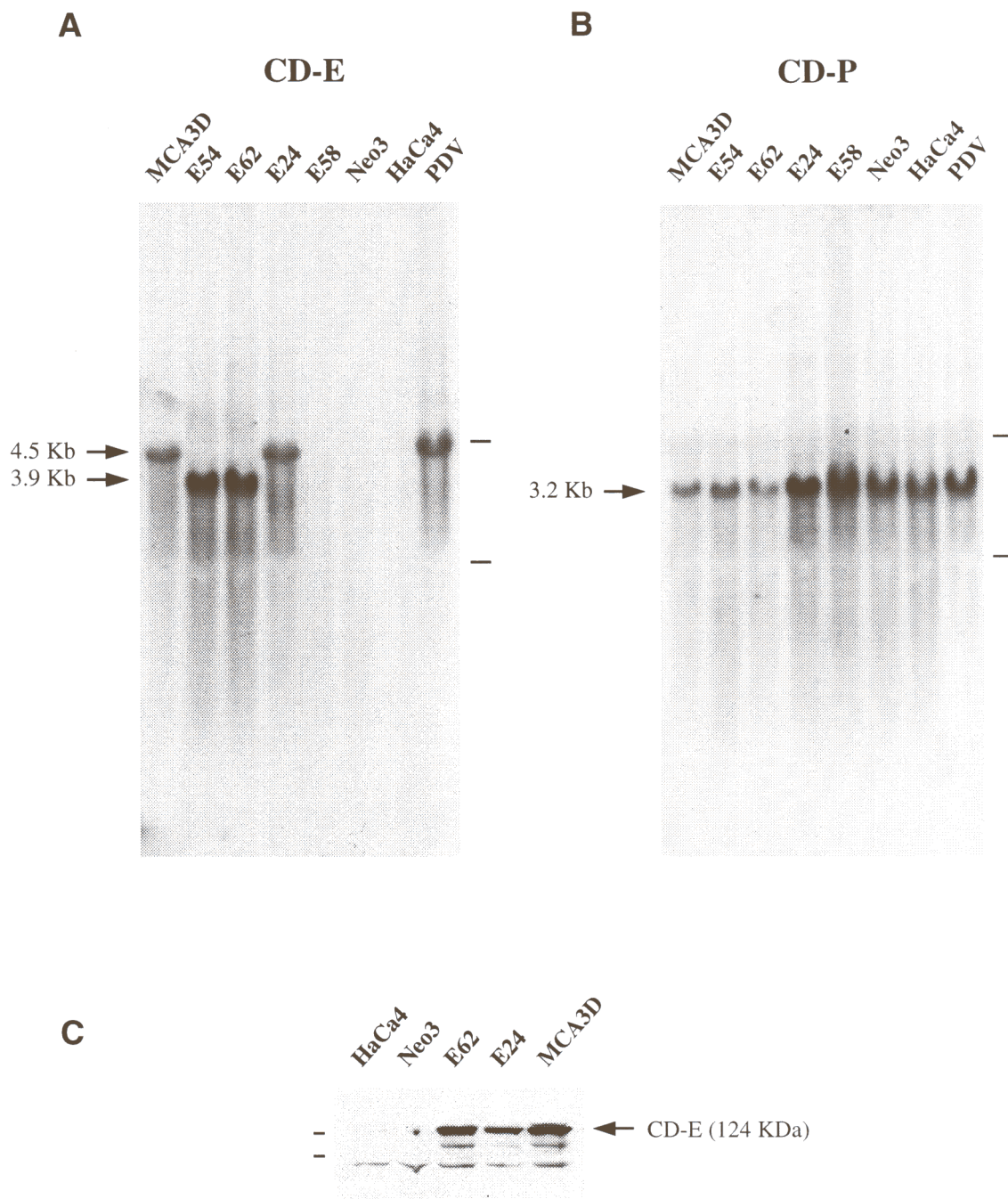


Fig. 8. Expresión de cadherinas en las líneas de queratinocitos de ratón.

A y B. Análisis de Northern-blot para CD-E y CD-P. 30 µg de RNA total se sometieron a ensayos de Northern-blot con una sonda de cDNA de CD-E (A) y posteriormente con una sonda de cDNA de CD-P (B). Se indican con barras la migración de los RNA ribosómicos 28S y 18S. Las bandas de RNA correspondientes a CD-E y CD-P se indican con flechas a la izquierda. Observar que el tamaño del mRNA de CD-E endógeno es ligeramente mayor (4.5 Kb) al transfectado (3.9 Kb, carriles de E54 y E62). E54 es una línea obtenida en el experimento de transfección de HaCa4 con el cDNA de CD-E (Navarro *et al.*, 1991). El resto de líneas celulares se describe en el texto.

C. Ensayo de inmunoblot para CD-E. 35 µg de extracto de proteína de las líneas indicadas se sometieron a inmunoblot con el anticuerpo ECCD-2. Se indica con una flecha la banda específica correspondiente a CD-E y con pequeñas barras a la izquierda los marcadores de peso molecular de 116 y 97.4. La banda de aproximadamente 105 KDa corresponde a un fragmento de degradación de CD-E, mientras que la banda de aproximadamente 95 KDa es inespecífica.

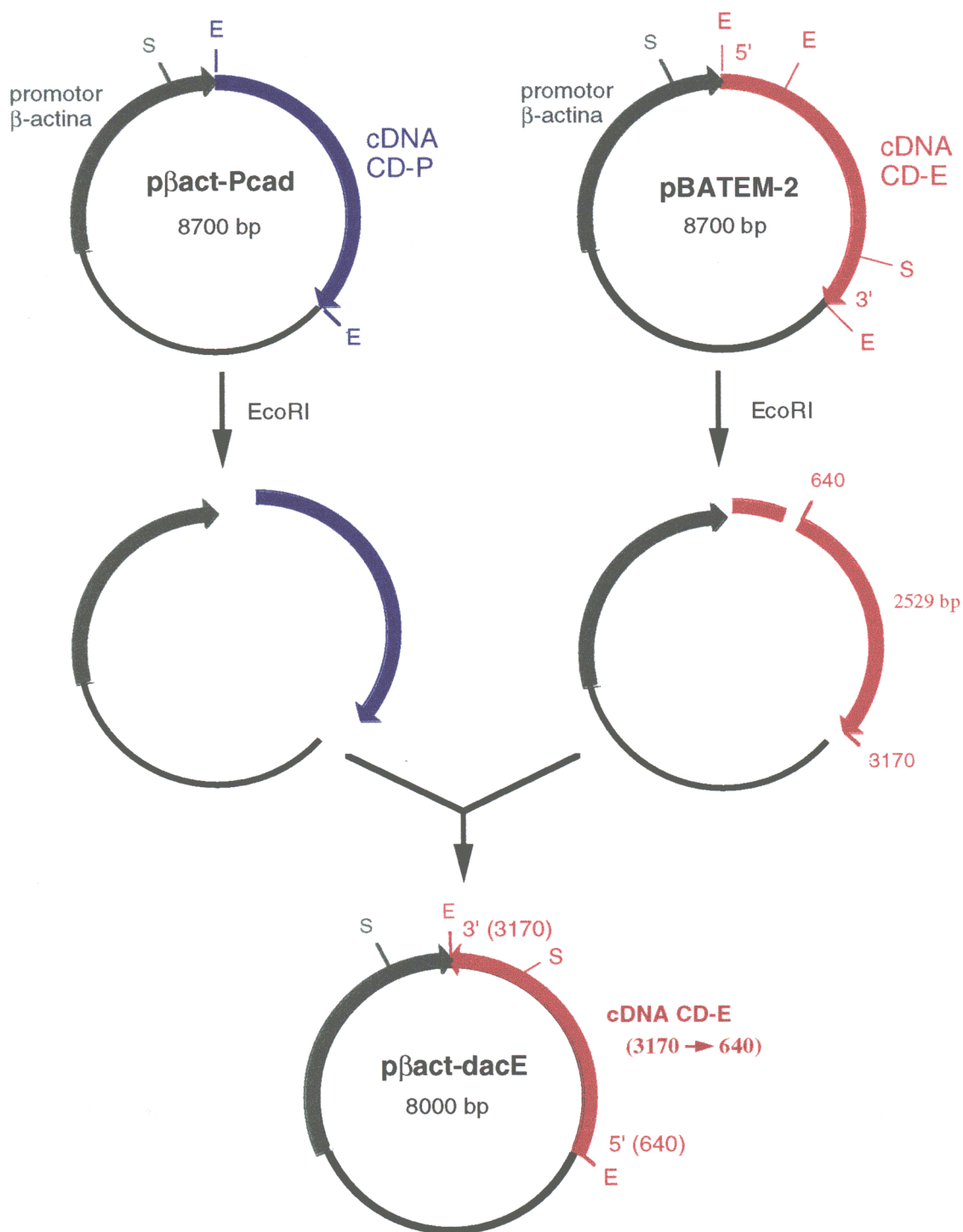


Fig. 9. Construcción del vector antisense de CD-E pβact-dacE. El fragmento EcoRI de 2.5 Kb correspondiente a los nucleótidos 640 a 3170 del cDNA de CD-E (rojo) se insertó en dirección inversa en el vector pβact-Pcad tras eliminar la región codificante de CD-P (azul). De esta forma, el vector pβact-dacE contenía un fragmento del cDNA de CD-E en dirección inversa, respecto al promotor de β-actina (verde). E, EcoRI. S, SmaI. El sitio SmaI se empleó para comprobar la orientación del inserto.

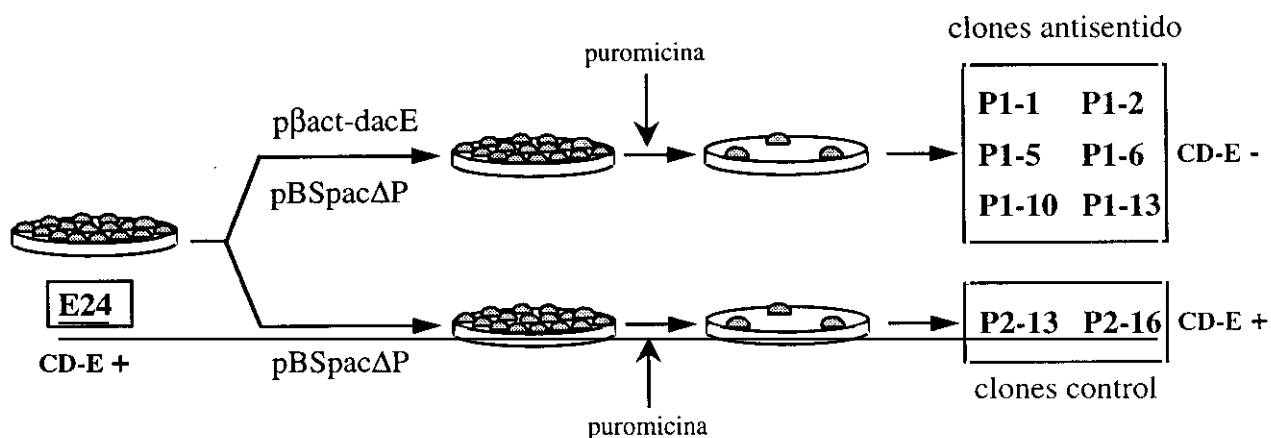


Fig. 10. Esquema del experimento de transfección con el vector antisentido de CD-E y de los clones obtenidos. La línea celular E24 (que expresa CD-E y es resistente al antibiótico G418) se transfectó con el vector de resistencia a puromicina $pBSpac\Delta P$ sólo o junto con el vector de expresión antisentido del cDNA de CD-E $p\beta act-dacE$. Se seleccionaron clones aislados resistentes al antibiótico puromicina: clones control que mantenían la expresión de CD-E (P2-13 y P2-16) y clones antisentido que habían perdido la CD-E (P1-1, P1-2, P1-5, P1-6, P1-10 y P1-13). CD-E + y CD-E -, clones que expresan y no expresan CD-E, respectivamente.

CD-E en dichos clones por inmunofluorescencia. Se seleccionaron así, para su posterior estudio los siguientes clones :

Antisentido: P1-1, P1-2, P1-5, P1-6, P1-10, P1-13.

Control: P2-13 y P2-16.

1.2. Caracterización inicial de los transfectantes.

Análisis de inmunofluorescencia y de inmunoblot mostraron que, tanto la línea parental (E24) como los clones control (P2-13 y P2-16) expresaban CD-E que se localizaba principalmente en los contactos célula-célula (Fig. 11 y 12A). En cambio, los clones transfectados con el vector antisentido de CD-E (P1-1, P1-2, P1-5, P1-6, P1-10 y P1-13) eran negativos o expresaban muy bajos niveles de CD-E (Fig. 12A). Tan sólo en algunos clones aparecían esporádicamente células aisladas o pequeños grupos de 2-3 células teñidas para CD-E, en capas suprabasales (observar Fig. 11, clon P1-5). Esta tinción esporádica también se observó ocasionalmente en la línea HaCa4.

La CD-P, la otra molécula de la familia de las cadherinas que se expresa en queratinocitos, presenta alta homología con la CD-E (58% de identidad aminoacídica). Por tanto, para comprobar la especificidad del experimento de transfección, fué necesario corroborar que el vector antisentido de CD-E no bloqueaba también la expresión de CD-P. Análisis de inmunofluorescencia (Fig. 11) y de inmunoblot (Fig. 12B) con el anticuerpo PCD-1 mostraron que todos los clones seguían manteniendo la expresión de CD-P, y que ésta se localizaba en las uniones celulares, como corresponde a su función adherente.

La morfología de los transfectantes (Fig. 11) no se alteró significativamente, manteniendo el fenotipo epitelial, aunque en algunos caso las células tienden a ser más pequeñas y redondeadas. La única diferencia morfológica destacable fué la pérdida a la tendencia a estratificar, característica de E24, que se mantuvo en las líneas control (observar Fig. 11). Esta tendencia a la estratificación se ha relacionado con un estado más diferenciado, a semejanza de lo que ocurre en una piel normal estratificada, donde las capas superiores son las más diferenciadas. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de involucrina (Fig. 12C), marcador de diferenciación terminal en células epiteliales.

1.3. Ensayos de migración *in vitro*.

La línea parental E24, el clon antisentido P1-5 y el control P2-13 se seleccionaron para una primera caracterización de la capacidad invasiva de estas células. Se midió su capacidad migratoria a través de geles de colágeno y se comparó con la de la línea celular HaCa4 (CD-E negativa).

Como se puede observar en la figura 13, el clon control P2-13 mantuvo una muy baja capacidad migratoria, al igual que la línea E24, mientras que el transfectante antisentido

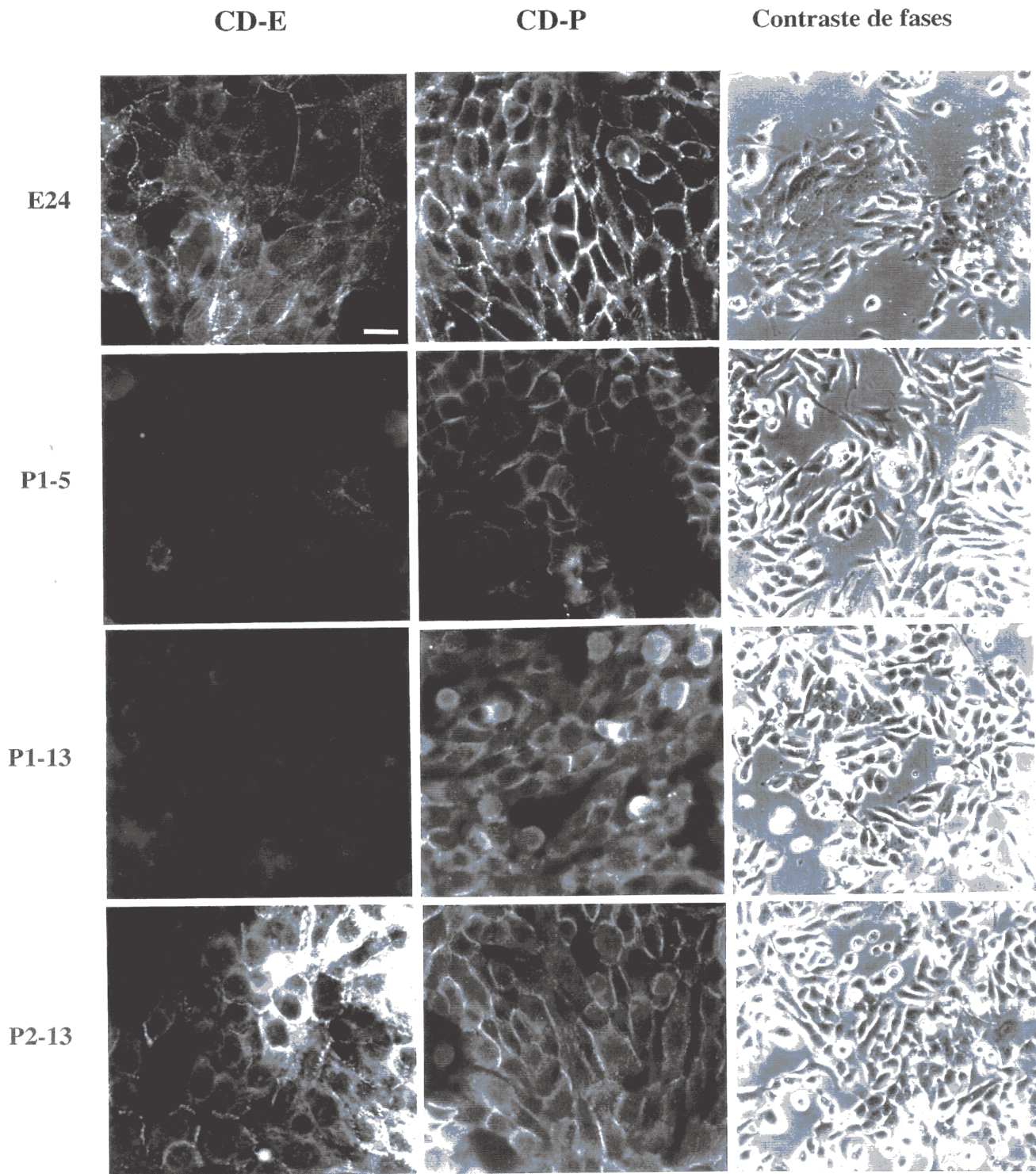


Fig. 11. Análisis morfológico y por inmunofluorescencia de los transfectantes.

Paneles izquierdo y central: Las células crecidas en cubreobjetos y fijadas con metanol se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD-E (ECCD-2) y anti-CD-P (PCD-1), respectivamente, seguido de anticuerpos secundarios anti-rata acoplados a rodamina. La barra de aumento corresponde a 15 μ m.

Panel derecho: las células en cultivo se fotografiaron con un microscopio de contraste de fases (objetivo de 10 aumentos).

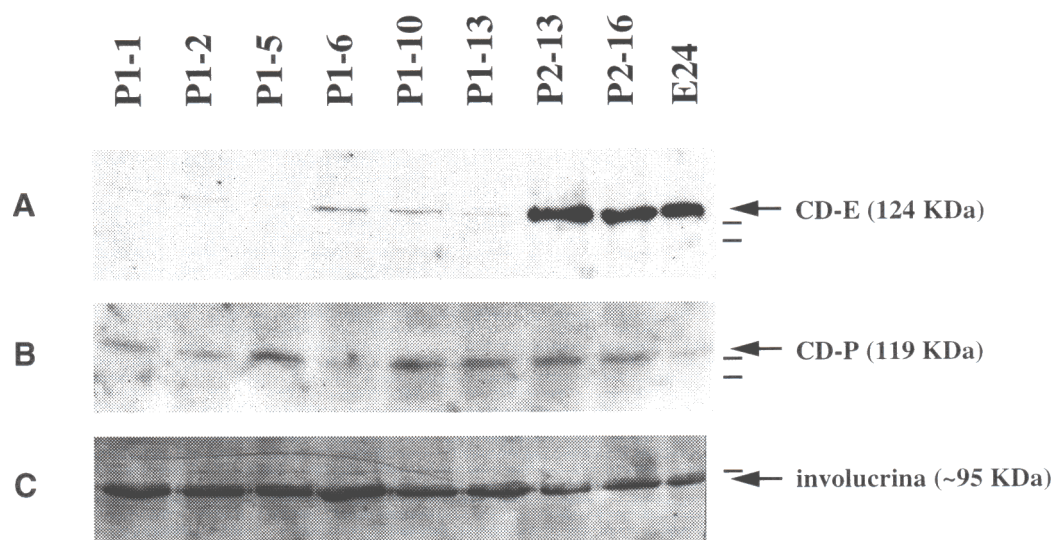


Fig. 12. Análisis por inmunoblot de marcadores epiteliales en los transfectantes. 35 μ g de extracto total de las distintas líneas celulares se sometieron a inmunoblot con anticuerpos anti-CD-E (ECCD-2) (panel A), anti-CD-P (PCD-1) (panel B) o anti-involucrina (panel C). Las flechas indican las bandas correspondientes a CD-E (124 KDa), CD-P (119 KDa) e involucrina (95 KDa aprox.). Los marcadores de peso molecular de 116 y 97.4 KDa para las cadherinas, y de 97.4 KDa para involucrina se indican con pequeñas barras a la derecha de cada panel.

P1-5 presentó una elevada capacidad migratoria a través de geles de colágeno, muy similar a la de la línea HaCa4.

Estos resultados muestran una correlación inversa entre la expresión de CD-E y la capacidad invasiva *in vitro* de las líneas celulares, corroborando observaciones previas.

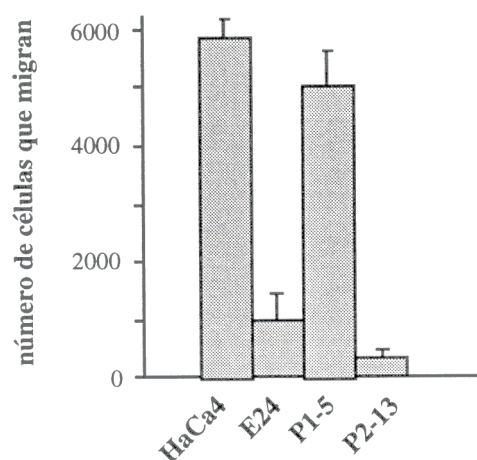


Fig. 13. Ensayo de migración en geles de colágeno tipo IV. Se midió la capacidad migratoria de las líneas indicadas en geles de colágeno tipo IV empleando la cámara de Boyden modificada y utilizando medio condicionado de fibroblastos NIH3T3 como quimioatrayente (ver Métodos, Apto. 4). En ordenadas se indica el número de células que atravesaron el filtro y pasaron al compartimento inferior. Las medidas se hicieron por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones standard.

1.4. Comportamiento *in vivo* de los transfectantes.

Para comprobar si la mayor capacidad migratoria *in vitro* inducida por la ausencia de CD-E se correspondía con un comportamiento más agresivo *in vivo*, se analizó la capacidad tumorigénica y metastásica de los transfectantes.

Los ensayos de tumorigenicidad se realizaron por inyección subcutánea de las células en ratones atímicos. Las diferentes líneas celulares (transfectantes antisentido y control) originaron tumores epidermoides moderadamente diferenciados en todos los sitios de inyección, similares a los producidos por E24 (Tabla IV y resultados no mostrados). No se apreciaron diferencias significativas ni en los períodos de latencia ni en la velocidad de crecimiento de los tumores entre las líneas antisentido y control y la línea parental E24.

La capacidad metastásica de las líneas celulares se analizó inyectando intradérmicamente las células en ratones atímicos y extirpando los tumores generados cuando alcanzaron un tamaño de 1.2 cm de diámetro. Los ratones se sacrificaron a los 10-60 días

tras la extirpación del tumor primario o cuando estaban moribundos. Ni E24 ni los controles de la transfección generaron focos metastásicos (hasta 60 días después de extirpar el tumor) (Tabla IV). Por el contrario, los transfectantes antisentido analizados (P1-5, P1-10 y P1-13) originaron metástasis pulmonares en todos los casos, con un nivel variable de focos por pulmón. Sólo se encontraron focos metastásicos en los pulmones, y no en otras vísceras.

Estos resultados apoyan fuertemente el papel de la CD-E como molécula anti-invasiva. El bloqueo de la expresión de CD-E en la línea E24 induce un fenotipo invasivo y metastásico.

Tabla IV. Análisis de la capacidad metastásica de HaCa4, E24 y los clones transfectados con el cDNA antisentido de CD-E⁽¹⁾.

Línea celular	Metástasis pulmonar		nº de focos por ratón	experimento
	Incidencia tumoral ⁽²⁾	Incidencia de metástasis ⁽²⁾		
HaCa4	5/5	5/5	1-19	c
HaCa4	2/2	2/2	>10	a
E24	6/6	0/6	-	c
E24	5/5	0/5	-	d
P1-5	4/4	4/4	1-3	b
P1-10	4/4	4/4	5-19	b
P1-13	5/5	5/5	1-19	b
P2-13	6/6	0/6	-	d
P2-16	5/5	0/5	-	b
P2-16	6/6	0/6	-	d
MCA3D	0/6	-	-	c

(1) 1×10^6 células de las líneas indicadas se inocularon en un flanco de ratones BALB/c inmunodeprimidos. Los tumores se extirparon cuando alcanzaron un diámetro de 1.2 cm. Los ratones se sacrificaron para analizar las metástasis pulmonares cuando estaban moribundos o a los 10-21 (a), 20-40 (b), 30-47(c) o 60 (d) días después de la excisión del tumor primario. Sólo se encontraron focos metastásicos en los pulmones y no en otras vísceras.

(2) La incidencia tumoral y de metástasis se expresa como número de ratones que generaron tumor o metástasis pulmonar / número de ratones totales inoculados.

1.5. Niveles de Ha-ras.

A continuación tratamos de determinar cuales eran los mecanismos mediante los cuales la ausencia de CD-E inducía este comportamiento más agresivo, volviendo a las células metastásicas. Una posible explicación, teniendo en cuenta los estudios previos sobre la relación entre la dosis de Ha-ras oncogénico y la capacidad metastásica, sería que los transfectantes antisentido hubieran incrementado los niveles de Ha-ras, debido a la transfección o por un proceso de selección.

Por tanto, se analizaron los niveles de Ha-ras viral y celular mediante ensayos de Northern-blot en las líneas transfectantes antisentido y control y se compararon con los niveles de las líneas E24 y HaCa4. La línea celular MCA3D, que sólo expresa Ha-ras endógeno de ratón, se utilizó como control. Todos los clones, salvo MCA3D, expresaban el mRNA genómico viral de 5.4 Kb y una serie heterogénea de transcritos de tamaños comprendidos entre 1.4 y 5.4 Kb (Caulín *et al.*, 1996 y resultados no mostrados). Los resultados, después de normalizar respecto a la cantidad de mRNA de actina, aparecen reflejados en la Tabla V. La línea celular HaCa4 presentaba niveles elevados de v-Ha-ras, mientras que los transfectantes, control y antisentido, mostraron niveles de v-Ha-ras semejantes a los de la línea E24, y menores a los de HaCa4.

Por tanto, la dosis de Ha-ras no se modificó por la transfección con el vector antisentido, por lo que no parece ser la responsable del fenotipo metastásico inducido por la ausencia de CDE en la línea E24.

Tabla V. Expresión de v-Ha-ras en HaCa4, E24 y los clones transfectantes con el cDNA antisentido de CD-E ⁽¹⁾.

Línea celular ⁽²⁾	v-Ha-ras ⁽³⁾
HaCa4	3.97
E24	0.62
P2-13	0.63
P1-5	0.70
P1-13	0.85
MCA3D	-

(1) 15 µg de mRNA poli-A⁺ se sometieron a ensayos de Northern-blot hibridando sucesivamente con una sonda de Ha-ras y con una sonda de β-actina como control.

(2) La línea celular MCA3D sólo expresa Ha-ras celular endógeno y se incluyó como control.

(3) Los valores representan la relación de los niveles de mensajero de v-Ha-ras y de β-actina en cada línea celular, tras su cuantificación densitométrica.

1.6. Papel de proteasas de matriz extracelular.

1.6.1. Activador del plasminógeno tipo urokinasa.

El activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular y su expresión se ha relacionado con la capacidad invasiva y metastásica de un amplio espectro de tumores y líneas celulares (Andreasen *et al.*, 1997).

Por tanto, nos planteamos averiguar si en nuestro sistema experimental el bloqueo de CD-E también era capaz de inducir un aumento de la actividad uPA, que fuera responsable del comportamiento más maligno observado. Se midió la actividad uPA en extractos totales y en el medio condicionado de los transfectantes en geles de caseína-plasminógeno. La figura 14 muestra que existen variaciones en los niveles de actividad uPA, especialmente del secretado al medio extracelular, entre los diferentes clones, pero la ausencia de CD-E no provocó en estas células un incremento de la actividad uPA. Por lo tanto, el uPA no parece ser el agente que induce el fenotipo más invasivo y metastásico que muestran los transfectantes.

1.6.2. Metaloproteinasas de matriz.

Como se ha indicado en la Introducción, las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son proteasas que degradan y remodelan la matriz extracelular y que juegan un importante papel en procesos de invasión tumoral y metástasis (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Para estudiar si las MMPs estaban jugando un papel en el comportamiento invasivo inducido por la ausencia de CD-E se analizó la actividad gelatinolítica de los transfectantes. La figura 15A muestra un zimograma donde se ensayó la actividad gelatinolítica del medio condicionado de las células en geles de gelatina (colágeno soluble desnaturalizado). Como se puede observar, ni la línea parental E24, ni la línea control P2-13, mostraron actividad gelatinolítica. En cambio, los transfectantes antisentido presentaron una destacable actividad gelatinolítica, que migraba con un tamaño aparente de 105 KDa, correspondiente con la gelatinasa B o MMP-9 de ratón (Tanaka *et al.*, 1993). Asimismo, las líneas HaCa4 y Neo3 (control de transfección de HaCa4) presentaron niveles elevados de actividad MMP-9. Tan solo después de largos tiempos de incubación se pudo observar además una banda de degradación a 68 KDa, correspondiente a la MMP-2, de similar intensidad en todas las células. MMP-9 y MMP-2 son las únicas MMPs conocidas capaces de degradar colágenos desnaturalizados (ver Tabla I).

Estudios de Northern-blot (Fig. 15B) mostraron que el transfectante antisentido P1-5 expresaba cantidades significativas de mRNA de MMP-9, mientras que los transfectantes P1-10 y P1-13 y el clon P2-16 expresaban pequeñas cantidades. Sin embargo, E24 no presentó niveles apreciables de mRNA de MMP-9. La sonda de MMP-9 identificó dos transcritos de 3.5 y 2.7 Kb, probablemente resultantes de diferentes señales de poliadenilación (Tanaka *et al.*, 1993).

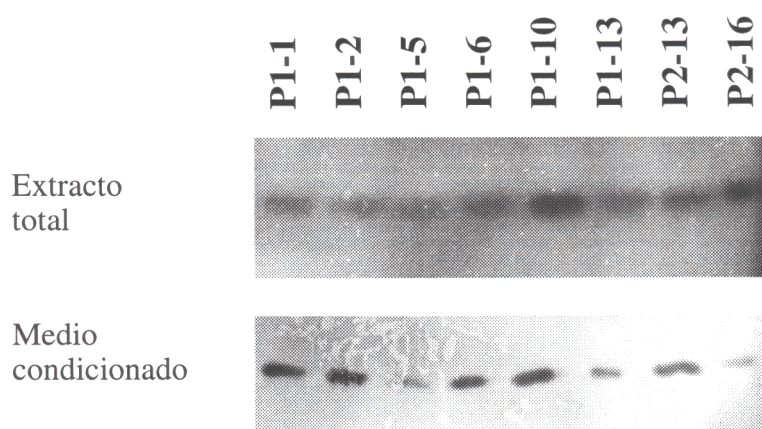


Fig. 14. Zimograma para detección de uPA en extracto total y en el medio condicionado de los transfectantes antisentido de CD-E. 35 μ g de extracto total (parte superior) o 10 μ g de medio condicionado (parte inferior) de las líneas indicadas se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS). Tras eliminar el SDS de los geles por lavados en Triton-X100, éstos se superpusieron sobre geles de agarosa con caseína-plasminógeno-Cl 2Ca o sobre geles control que carecían de plasminógeno, y se incubaron durante 20 h a 37°C. Al colocar los geles sobre un fondo oscuro se aprecian las bandas transparentes de degradación de la caseína por el plasminógeno activado por el uPA. Los geles control sin plasminógeno no presentaron bandas de degradación (no mostrado).

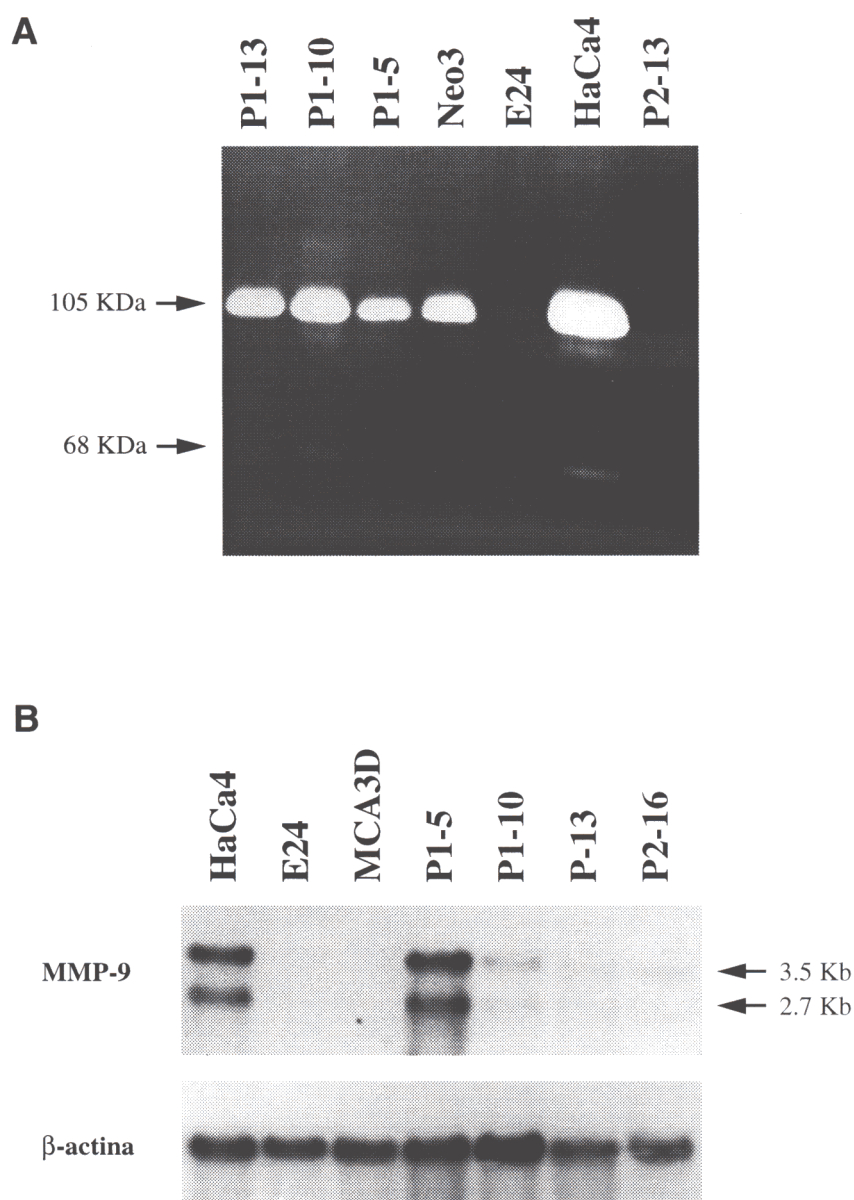


Fig. 15. Análisis de gelatinasas en las líneas HaCa4, E24 y los clones antisense de CD-E.

A. Análisis por zimografía en gel de gelatina de las MMPs secretadas por las líneas celulares. Cantidades equivalentes (12 µg de proteína) de medio condicionado de las líneas celulares indicadas se corrieron en geles PAGE-SDS embebidos en gelatina. Tras renaturalizar los geles e incubar durante 48 h las gelatinasas presentes se detectaron como bandas claras de degradación. Se indican con flechas las dos bandas detectadas y los pesos moleculares aproximados calculados. La banda principal de 105 KDa corresponde con el tamaño de la gelatinasa B o MMP-9 de ratón.

B. Análisis por Northern-blot de la expresión de MMP-9. 15 µg de mRNA poli-A+ de las líneas indicadas se sometieron a ensayo de Northern-blot con una sonda para detectar MMP-9. La misma membrana se hibridó posteriormente con una sonda para β-actina, como control de carga. Se señalan con flechas los dos transcritos detectados de MMP-9 de tamaño aproximado 3.5 y 2.7 Kb.

Estos resultados sugieren que la ausencia de CD-E en los transfectantes antisentido induce un aumento en la actividad de la metaloproteinasa MMP-9, que podría deberse en parte al aumento en sus niveles de expresión. Un aumento en la actividad de dicha enzima podría favorecer las capacidades invasivas de estas células, al dotarles de un mecanismo por el que pueden degradar la matriz extracelular, escapar del tumor primario y producir metástasis.

1.7. Estudio de la relación entre CD-E y MMP-9.

Los resultados anteriores apoyan una interesante relación inversa entre CD-E y MMP-9, ya que al eliminar la CD-E se indujo en estas células un aumento en la actividad MMP-9. Asimismo, la línea celular MCA3D, no tumorogénica y con altos niveles de CD-E, carecía de actividad MMP-9 (no mostrado) y de mensajero de MMP-9 (Fig. 15B).

Para corroborar esta hipótesis se estudió la actividad y expresión de MMP-9 en relación con la CD-E en un conjunto de líneas originadas a partir de la transfección del cDNA de CD-E en HaCa4 (ver Tabla III y Figura 8).

La figura 16A muestra un zimograma sobre gelatina del medio condicionado secretado por estas líneas. Se observó que las líneas HaCa4, el control de la transfección Neo3 y E58 (CD-E negativa) mostraron niveles elevados de actividad MMP-9, mientras que las líneas que después de la transfección expresaban CD-E (E24 y E62), habían disminuido considerablemente la actividad gelatinolítica de 105 KDa correspondiente a MMP-9. Análisis de Northern-blot en estas líneas celulares mostraron asimismo altos niveles de mensajero de MMP-9 en las líneas celulares CD-E negativas HaCa4 y E58 y muy bajos niveles en las líneas CD-E positivas E24 y E62 (Fig. 16B).

El análisis mediante Northern-blot de los niveles del inhibidor específico de MMP-9, TIMP-1, indica que los niveles se mantienen constantes en todas estas líneas celulares (Fig. 17), independientemente de los niveles de CD-E o de MMP-9. Por tanto, los cambios en la actividad MMP-9 no se pueden explicar por cambios en los niveles de su inhibidor.

Por otro lado, también se analizó la expresión de otras MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-7) mediante Northern-blot o RT-PCR, siendo sus niveles apenas detectables en todas las líneas celulares. En la figura 17 aparece un experimento de Northern-blot para MMP-3 donde se observa que los niveles, extremadamente bajos (se muestra una autorradiografía tras un mes de exposición), son similares en todas las líneas.

Por tanto, la expresión de CD-E en la línea celular HaCa4 induce un descenso en los niveles y actividad de la gelatinasa MMP-9, corroborando la hipótesis de una regulación opuesta, por mecanismos desconocidos, entre CD-E y MMP-9 en líneas celulares de queratinocitos de ratón. Esta represión de MMP-9 mediada por CD-E podría ser uno de los mecanismos que contribuyen al fenotipo más agresivo mostrado tras la pérdida de CD-E en muchos tipos de carcinomas, y en especial durante la carcinogénesis de piel de ratón.

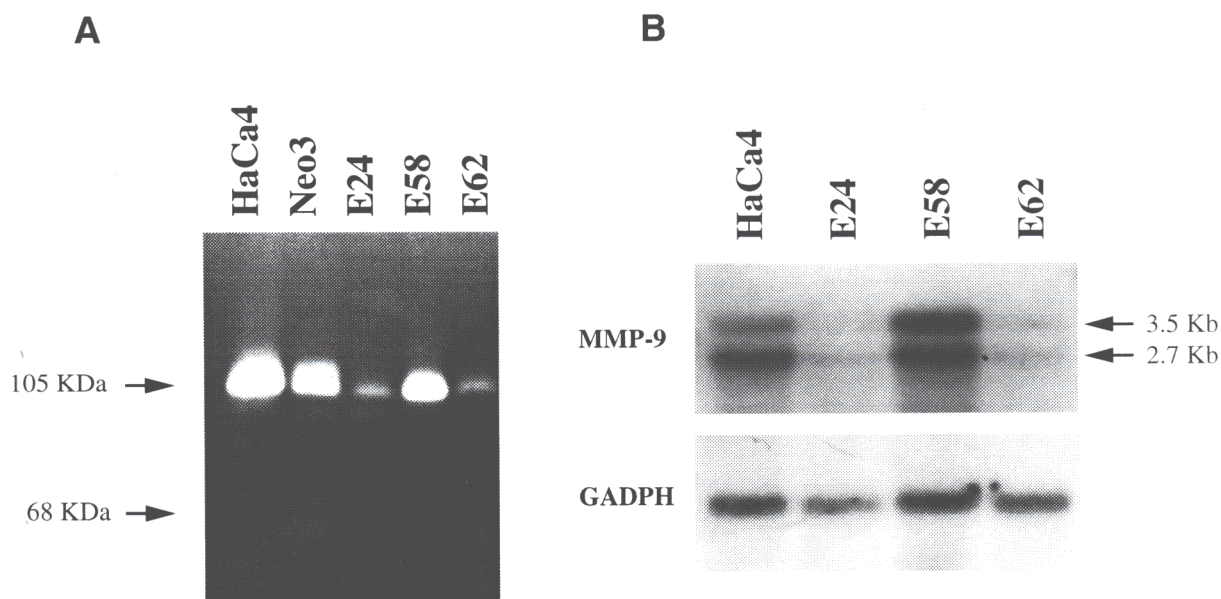


Fig. 16. Detección de actividad gelatinolítica y de expresión de MMP-9 en los clones derivados de la transfección de HaCa4 con el cDNA de CD-E.

A. El medio condicionado de cada línea celular que contenía 12 μ g de proteína se fraccionó en geles PAGE-SDS embebidos en gelatina. Tras renaturalizar los geles e incubar durante 48 h, las gelatinasas presentes se detectaron como bandas claras de degradación. Se indican los pesos moleculares aproximados calculados de las bandas de degradación. La banda principal de 105 KDa corresponde con el tamaño de la gelatinasa B o MMP-9. Las líneas celulares HaCa4, Neo3 y E58 no expresan CD-E, mientras que E24 y E62 sí lo hacen (ver detalles en el texto).

B. 15 μ g de mRNA poli-A+ de las líneas indicadas se sometieron a ensayo de Northern-blot con una sonda para MMP-9. La misma membrana se hibridó posteriormente con una sonda para detectar GAPDH, como control de carga. Se señalan con flechas los dos transcritos detectados de MMP-9 (3.5 y 2.7 Kb).

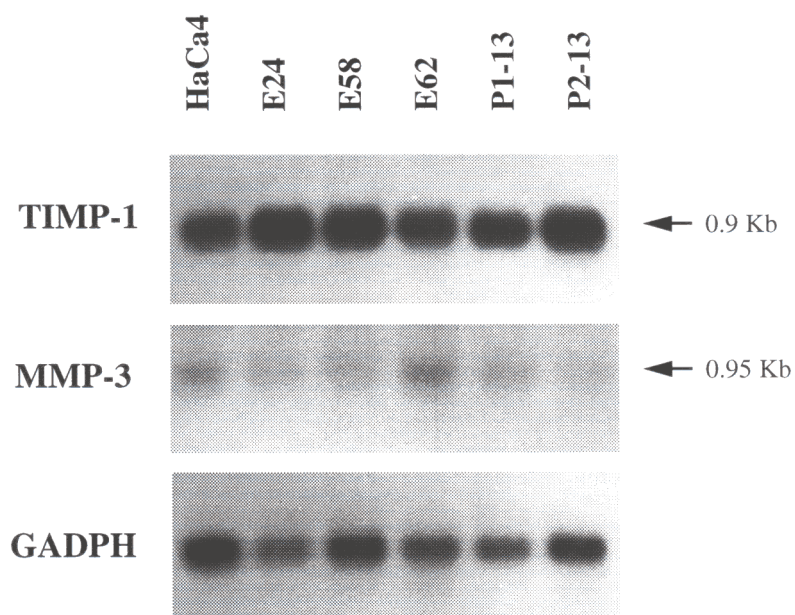


Fig. 17. Análisis de la expresión de MMP-3 y TIMP-1 en líneas celulares de queratinocitos de ratón. 15 μ g de mRNA poli-A+ de las líneas indicadas se sometieron a ensayo de Northern-blot. La misma membrana se hibridó, en sucesivas veces, con una sonda para TIMP-1, MMP-3 y GADPH como control de carga. Se indican los tamaños de los transcritos detectados.

2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD-E EN LA CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATÓN.

Como hemos visto, la molécula de adhesión celular CD-E desempeña un papel clave en el control de la capacidad tumorogénica, invasiva y metastásica durante la progresión tumoral. Por tanto, para comprender en último término los mecanismos de la progresión maligna, es necesario también conocer los mecanismos de control de la expresión y función de CD-E.

En concreto nos propusimos analizar los mecanismos que regulan de la expresión de CD-E, y utilizamos, asimismo, el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón. Este modelo resultaba útil para estudiar, por una parte, los mecanismos que controlan la expresión específica de tejido epitelial de CD-E y, por otra parte, los mecanismos que conducen a la desaparición de la expresión de CD-E durante la progresión tumoral.

2.1. Actividad del promotor de CD-E en queratinocitos de ratón.

Para abordar estos objetivos empleamos un conjunto de líneas celulares de queratinocitos de ratón que representaban distintos estadios de la progresión tumoral, provenientes de tumores epidermoides e indiferenciados o derivadas *in vitro* a partir de cultivos primarios de epidermis (ver Fig. 5), que abarcan desde queratinocitos inmortalizados no tumorogénicos hasta líneas altamente malignas, y que mostraban diferentes niveles de expresión de CD-E.

En la Tabla VI se resumen las características más significativas de dichas líneas celulares. Brevemente, la línea celular MCA3D, como ya se ha indicado, es una línea inmortal no tumorogénica, de fenotipo epitelial, y que presenta niveles elevados de expresión de CD-E. Las líneas celulares PDV y E24 son tumorogénicas, pero aún conservan un fenotipo epitelial y expresan CD-E. La línea HaCa4 presenta ya un fenotipo epiteloide y ha perdido la expresión de CD-E. Todas estas líneas celulares expresan CD-P. Por último, las líneas celulares CarB y MSC11A5, representantes del último estadio de la carcinogénesis, son líneas altamente malignas, con fenotipo fibroblastoide, que han perdido la expresión de CD-E, CD-P y muchos otros marcadores epiteliales (Navarro *et al.*, 1991; Díaz-Guerra *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1992; Stoler *et al.*, 1993).

La pérdida de CD-E en estas líneas, al igual que en muchos tumores epiteliales, es a nivel de mRNA (ver Fig. 8A). Estudios previos de Southern-blot descartaron la existencia de grandes alteraciones en el gen de CD-E en las líneas celulares mencionadas (Navarro *et al.*, 1991), sugiriendo que probablemente sean mecanismos transcripcionales los que controlen la desaparición de dicha molécula. Para testar esta hipótesis se analizó la actividad promotora de un fragmento situado en posición 5' del gen de CD-E de ratón, que comprendía los

Tabla VI . Características de las líneas celulares de queratinocitos de ratón empleadas en los estudios sobre el promotor de CD-E.

línea celular	Morfología *	Niveles[#] de CD-E	Niveles[#] de CD-P	Tumorige-^{&}nicidad
MCA3D	E	++	+ / ++	-
PDV	E	+	+++	+
E24	E	+ / ++	+++	+
HaCa4	Ep	-	++	++
CarB	F	-	-	++
MSC11A5	F	-	-	++

* E, epitelial; Ep, epiteloide; F, fibroblastoide.

Los niveles relativos de CD-E y de CD-P se estimaron a partir de datos de Northern e inmunoblot (Navarro y col., 1991, ver también Fig. 8).

& La capacidad tumorigénica se determinó por inyección en ratones nu/nu, teniendo en cuenta el número de tumores originados y el período de latencia.

nucleótidos -178/+92 respecto del sitio de inicio de la transcripción (construcción -178, Fig. 18). Este fragmento contiene potenciales elementos reguladores: elemento E-pal (posición -90 a -71), conteniendo una secuencia palindrómica (-86/-75), caja CCAAT (posición -65 a -61) y región rica en GC (posición -58 a -32) y se había demostrado previamente, en otros sistemas celulares, que poseía actividad promotora específica de líneas celulares epiteliales (Behrens *et al.*, 1991).

Se realizaron ensayos de transfección transitoria en las distintas líneas de queratinocitos de ratón con plásmidos que contenían dicho fragmento, y varias construcciones menores de esta región, acoplados al gen chivato CAT. Como se muestra en la figura 18 la construcción -178 presentaba actividad específica de tipo celular, ya que mostraba niveles elevados de actividad transcripcional en la línea celular MCA3D, con altos niveles de mRNA de CD-E; niveles moderados en las líneas PDV y E24; y niveles muy bajos de actividad o era prácticamente inactiva en las líneas que no expresan CD-E (HaCa4 y CarB). La eliminación de la zona 5' hasta la posición -78, que comprende el elemento E-pal, provocó un aumento de la actividad promotora, sugiriendo la existencia de elementos que regulan negativamente la transcripción en esta región. Por otro lado, la supresión de otro

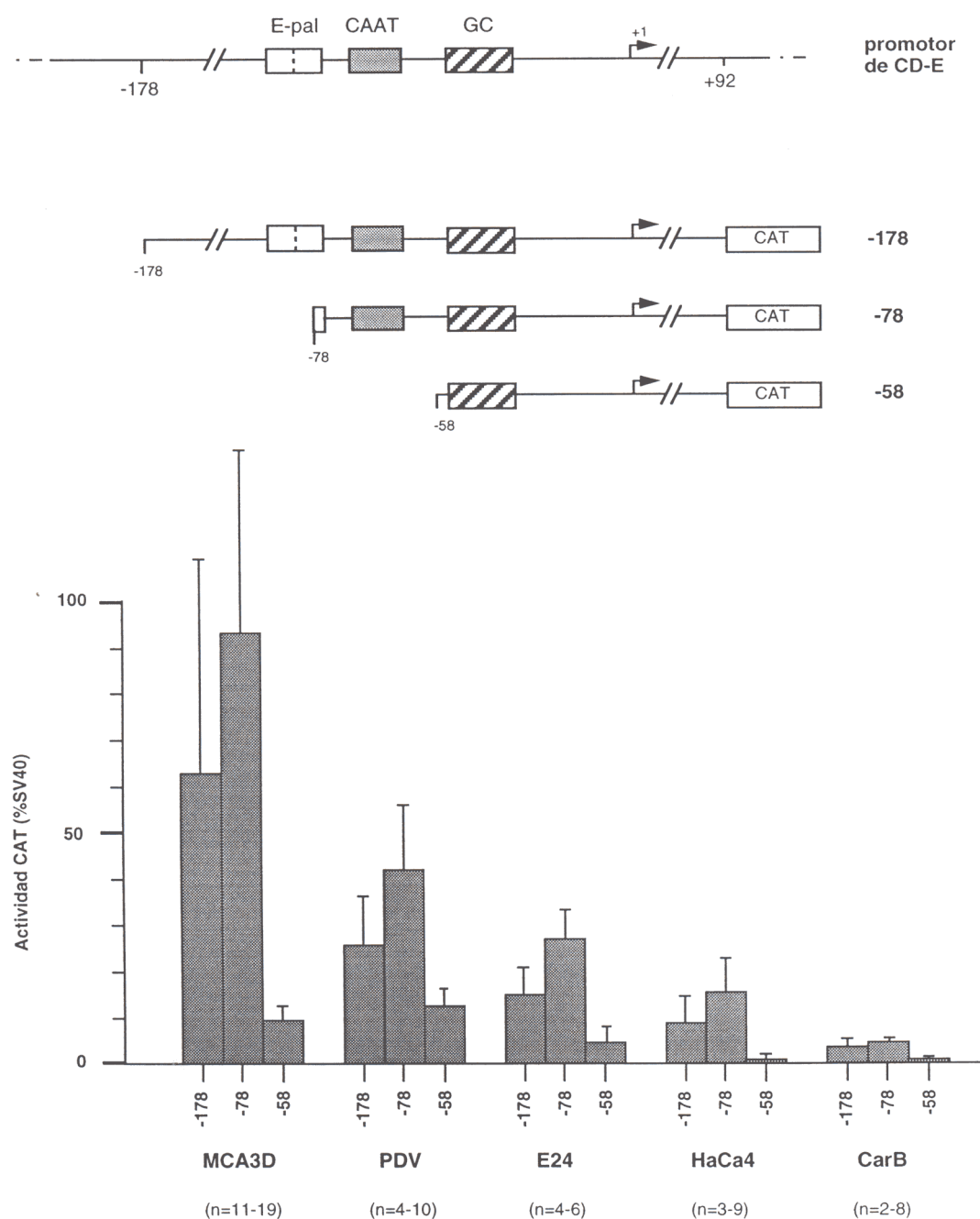


Fig. 18. Actividad transcripcional de distintas construcciones del promotor de CD-E en líneas de queratinocitos de ratón. Los valores de actividad CAT de las diferentes construcciones (panel superior) se normalizaron respecto a la actividad de CMV-luc en cada experimento y se expresaron como porcentaje de la actividad del promotor de SV40 en cada línea celular (panel inferior). Los valores representan la media de n experimentos independientes. Las barras de error indican las desviaciones standard.

fragmento hasta la posición -58, que incluye la caja CCAAT, indujo un dramático descenso de la actividad en todas las líneas celulares, lo que apoya que esta caja CCAAT estaría jugando un importante papel en el control positivo de la transcripción de CD-E. Esta construcción que comprende los nucleótidos -58/+92 presentaba ya niveles muy bajos de actividad promotora, pero aún retenía una cierta actividad específica de tipo celular.

La Tabla VII muestra un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de transfección transitoria con éstas y otras construcciones adicionales del promotor de CD-E. La construcción -94 mostró niveles de actividad muy similares a los de la construcción -178 en las líneas celulares examinadas. Asimismo, una construcción que comprendía los nucleótidos -21/+92 poseía niveles muy bajos de actividad transcripcional, próximos a los de la construcción -58, en las dos líneas celulares analizadas. El análisis de la actividad transcripcional de dos construcciones adicionales conteniendo secuencias hasta 800 bp y 1.4 Kb en dirección 5' respecto del sitio de inicio de la transcripción, en dos líneas positivas para la expresión de CD-E (MCA3D y E24), mostró valores similares a los de la construcción -178, aunque con variaciones entre las dos líneas. Estas observaciones están de acuerdo con estudios previos en otras líneas epiteliales (Behrens *et al.*, 1991). Por ello, y aunque no se pueda descartar la existencia de otras zonas de regulación, nos centramos en el estudio de la región -178/+92, que mostraba actividad transcripcional específica en las líneas de queratinocitos.

Para investigar el posible papel del elemento palindrómico E-pal en la actividad promotora de CD-E en este sistema celular, se midió la actividad de dos construcciones adicionales del promotor en ensayos de transfección transitoria en las diferentes líneas (Fig. 19). Tanto la construcción Δ E-pal, en la que se ha eliminado el elemento E-pal, como la construcción mE-pal, con una doble mutación puntual en los 2 nucleótidos centrales del palíndromo, mostraron mayor actividad promotora que la construcción silvestre (de 2 a 7 veces), siendo el aumento más significativo en las líneas que no expresan CD-E: un incremento de unas 3 veces en HaCa4 y de hasta casi 7 veces en la línea altamente indiferenciada CarB. Estos resultados sugieren un papel inhibidor para el elemento E-pal en todas las líneas de queratinocitos analizadas. Este elemento podría estar jugando un papel en la especificidad de la actividad transcripcional del promotor de CD-E, ya que el efecto represor es mayor en células CD-E negativas.

Asimismo, y para analizar la función de la región rica en GC se midió la actividad promotora de dos construcciones con mutaciones en los sitios consenso para AP2 y SP1 (construcciones mut GC1 y mut GC2, figura 20). Ambas mutaciones indujeron un descenso en la actividad promotora (60% en mut GC1 y 40-50% en mut GC2) en las líneas MCA3D y HaCa4, representantes de líneas que expresan y no expresan CD-E. Estos resultados indican que la región rica en GC, a través de los elementos de unión a SP1 y AP2, juega un papel regulador positivo en la transcripción de CD-E.

Tabla VII . Valores de actividad promotora de distintas construcciones del promotor de CD-E en las diferentes líneas celulares.

línea celular	Construcciones del promotor de CD-E *						
	-1.4	-0.8	-178	-94	-78	-58	-21
MCA3D	36.9	62.9	62.8	46.9	93.3	9.6	11.4
PDV	N.D.	N.D.	25.2	N.D.	41.9	12.3	N.D.
E24	13.4	6.7	14.7	N.D.	26.9	4.9	N.D.
HaCa4	N.D.	N.D.	8.5	11.0	15.7	0.8	0.7
CarB	N.D.	N.D.	3.3	3.2	4.7	0.9	N.D.

Los valores se indican como porcentaje de la actividad del promotor de SV40 en cada línea celular. Los datos representan la media de los resultados de un mínimo de dos experimentos.
N.D., no determinado.

* Las construcciones tienen todas el extremo 3' común en la posición +92. La posición del extremo 5' corresponde con el nombre de la construcción en Kb (-1.4 y 0.8) o en pb (el resto de las construcciones).

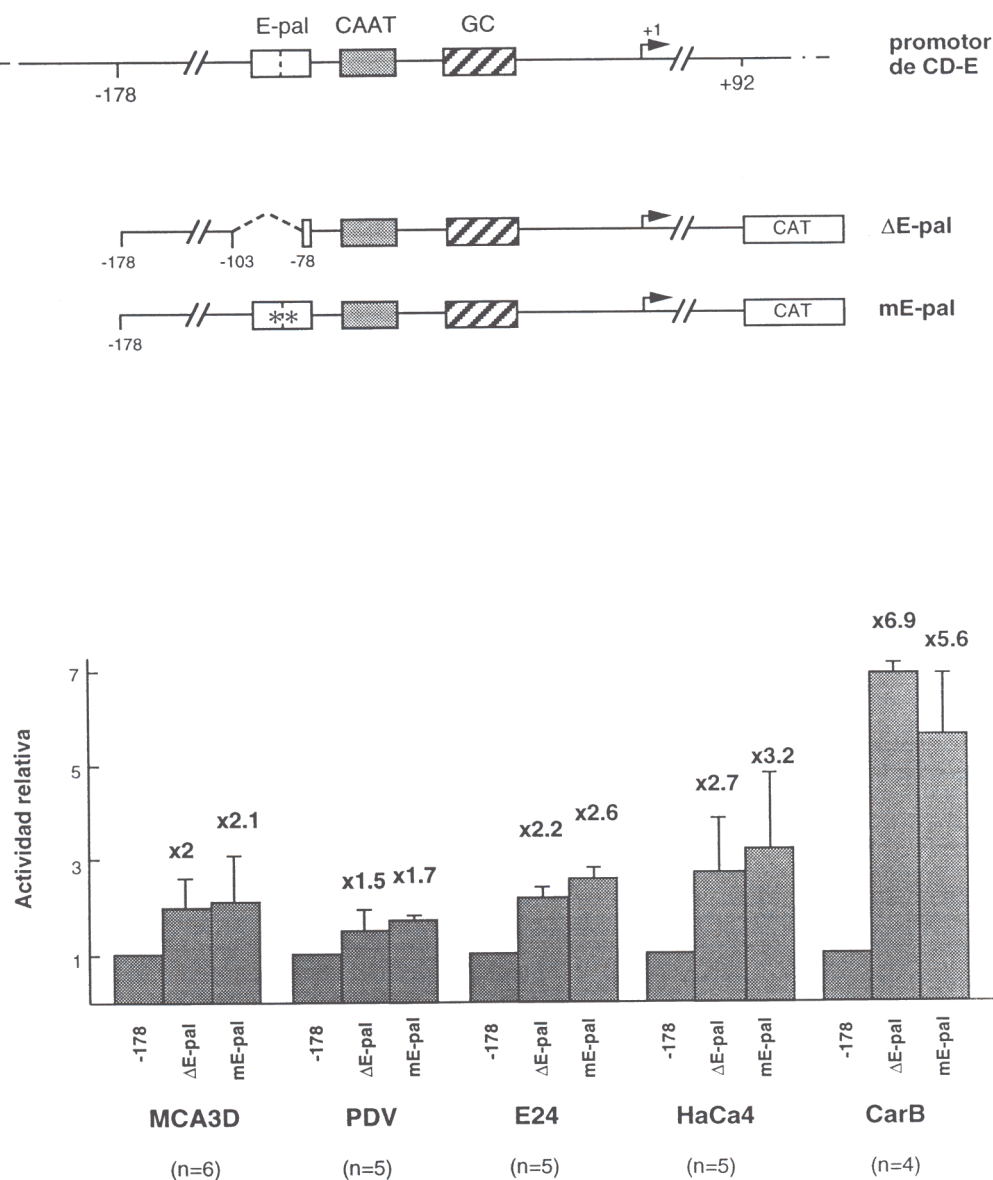


Fig. 19. Papel del elemento E-pal en la actividad transcripcional del promotor de CD-E. La actividad CAT de las construcciones del promotor de CD-E con el elemento E-pal mutado o truncado (panel superior) se normalizó respecto a la actividad CMV-luc. Los valores se muestran como actividad relativa respecto a la actividad de la construcción -178 en cada línea celular y representan la media de n experimentos independientes (panel inferior). Las desviaciones standard se representan como barras de error. Los números sobre las barras representan el número de veces de inducción en la actividad promotora, respecto al valor de la construcción silvestre -178.

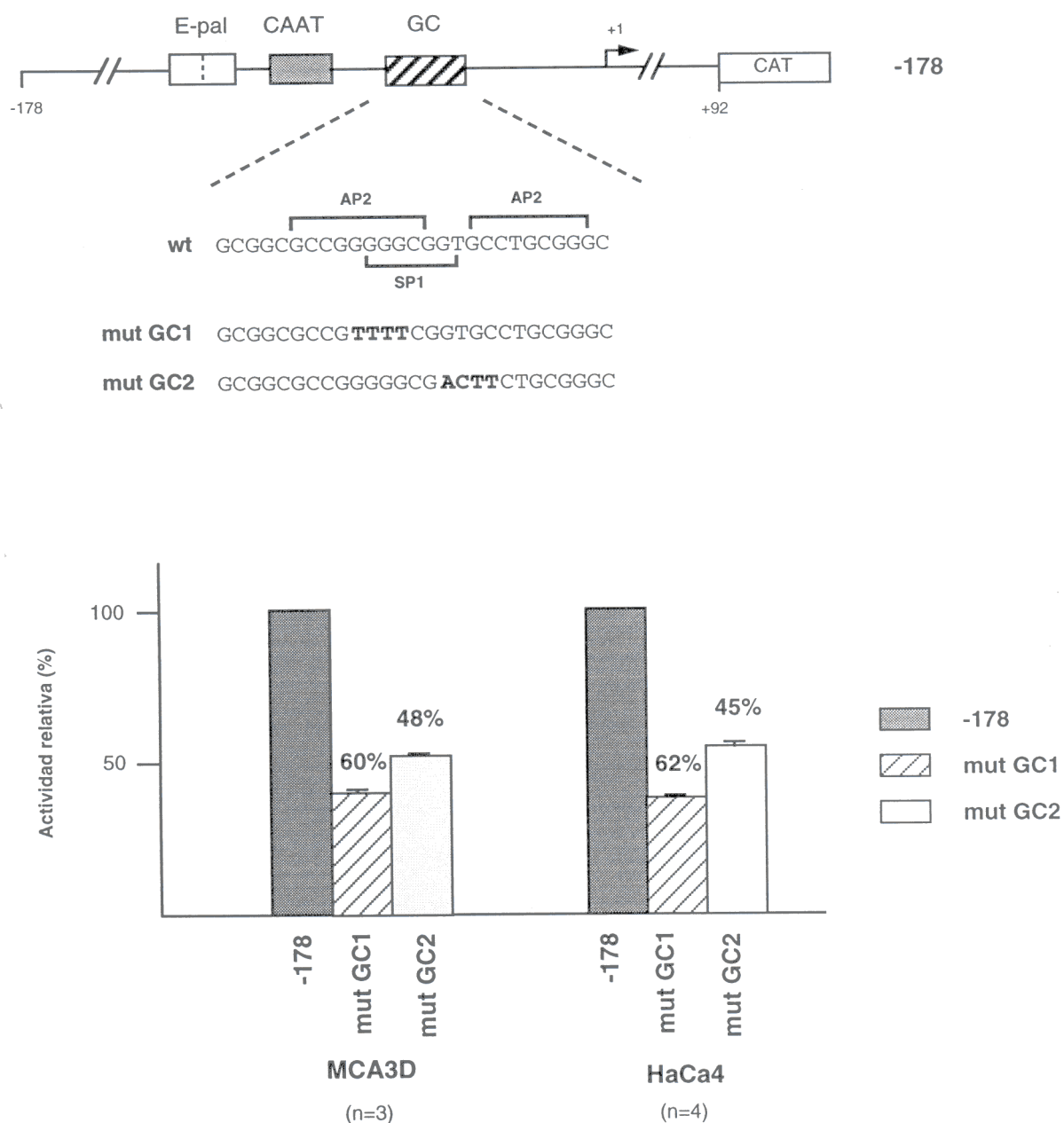


Fig. 20. Influencia de la región rica en GC en la actividad transcripcional del promotor de CD-E. La actividad CAT de las construcciones que se muestran en el panel superior se normalizó respecto a la actividad de CMV-luc. Los valores se muestran como actividad relativa respecto a la actividad de la construcción silvestre (wt) -178 en cada línea celular y representan la media de n experimentos independientes. Las desviaciones standard se representan como barras de error. Sobre las barras se indica el porcentaje de inhibición en la actividad transcripcional que induce la mutación.

2.2. Unión de factores nucleares al promotor de CD-E.

2.2.1. Interacción de factores nucleares con la región 5' proximal.

Como primera aproximación al estudio de los factores que interaccionan con la región 5' proximal en las diferentes líneas, y para delimitar las posibles secuencias de regulación de una forma más fina, se realizaron estudios de protección a DNAsa I o de footprinting *in vitro*.

La figura 21 muestra el patrón de protección que generaron extractos nucleares de las diferentes líneas celulares utilizando como sonda la región del promotor comprendida entre los nucleótidos -178/+17. Experimentos con extractos nucleares de las líneas positivas para CD-E, MCA3D y E24, mostraron 3 regiones protegidas (zonas a, b y c) y un sitio de hipersensibilidad, que corresponden a:

- región rica en GC y caja CCAAT (a);
- zona 3' del elemento E-pal (b);
- extremo 5' del elemento E-pal y región más distal (c);
- sitio de hipersensibilidad en la posición -85 de la secuencia E-pal (marcado con una flecha).

Por simplicidad, a partir de ahora llamaremos a la región protegida (c) como región ECE, ya que un análisis detallado de la misma mostró que contiene dos secuencias consenso para factores de la familia Ets y otra para factores tipo CREB/ATF (ver más adelante).

Por otro lado, extractos nucleares de líneas que no expresan CD-E (HaCa4 y CarB) mostraron un patrón de protección diferente:

- protección muy débil o prácticamente ausencia de protección en la región rica en GC/CCAAT (a);
- protección, aunque más débil, de la mitad 3' del elemento E-pal (b);
- ausencia del sitio de hipersensibilidad;
- ausencia de protección en la región ECE más distal (c).

Estos datos sugieren que en los queratinocitos que no expresan CD-E existe una pérdida o modificación de factores nucleares capaces de interaccionar con determinadas secuencias de la región 5' del gen de CD-E.

Para caracterizar los factores responsables del reconocimiento de la región 5' proximal, se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando como sonda, en primer lugar, el fragmento A, correspondiente a los nucleótidos -178/+92 de promotor de CD-E (ver figura 22A). Se emplearon extractos nucleares de las diferentes líneas de queratinocitos y de fibroblastos NIH3T3 como control adicional de células no epiteliales, que no expresan CD-E. Los extractos nucleares de todas las líneas celulares generaron una banda de retardo mayoritaria, y una serie de complejos de menor intensidad y mayor movilidad electroforética (Fig. 22B). Como se puede observar, el patrón de bandas generado fué básicamente el mismo con los extractos de todas las líneas, con la única diferencia de que la intensidad de la

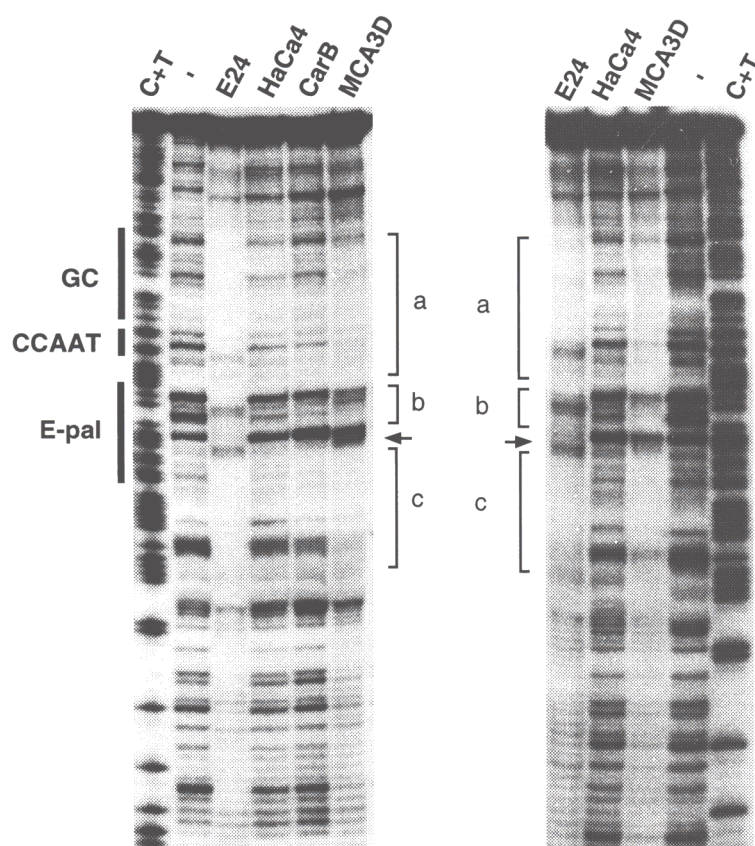


Fig. 21. Análisis de protección a DNAasaI o footprinting *in vitro* de la región 5' proximal del gen de CD-E en diferentes líneas de queratinocitos. La región -178/+17 del promotor de CD-E se utilizó como sonda para experimentos de protección a DNAasaI. La cadena no codificante se marcó en el extremo 3', se incubó en ausencia (-) o en presencia de extractos nucleares de las distintas líneas (45-70 µg) y se sometió a digestión con DNAasaI. Los productos obtenidos se analizaron en gel de secuenciación. Los corchetes (a, b, c) marcan regiones protegidas y la flecha un sitio de hipersensibilidad. C+T, productos de las reacciones de secuenciación G+A de Maxam-Gilbert sobre la sonda. Al ser la sonda la cadena no codificante, las bandas de este carril corresponden con las C y T de la secuencia de la cadena codificante del promotor de CD-E. La localización de las regiones E-pal, CCAAT y región rica en GC se indica con barras a la izquierda. Los paneles de la derecha e izquierda muestran dos experimentos independientes.

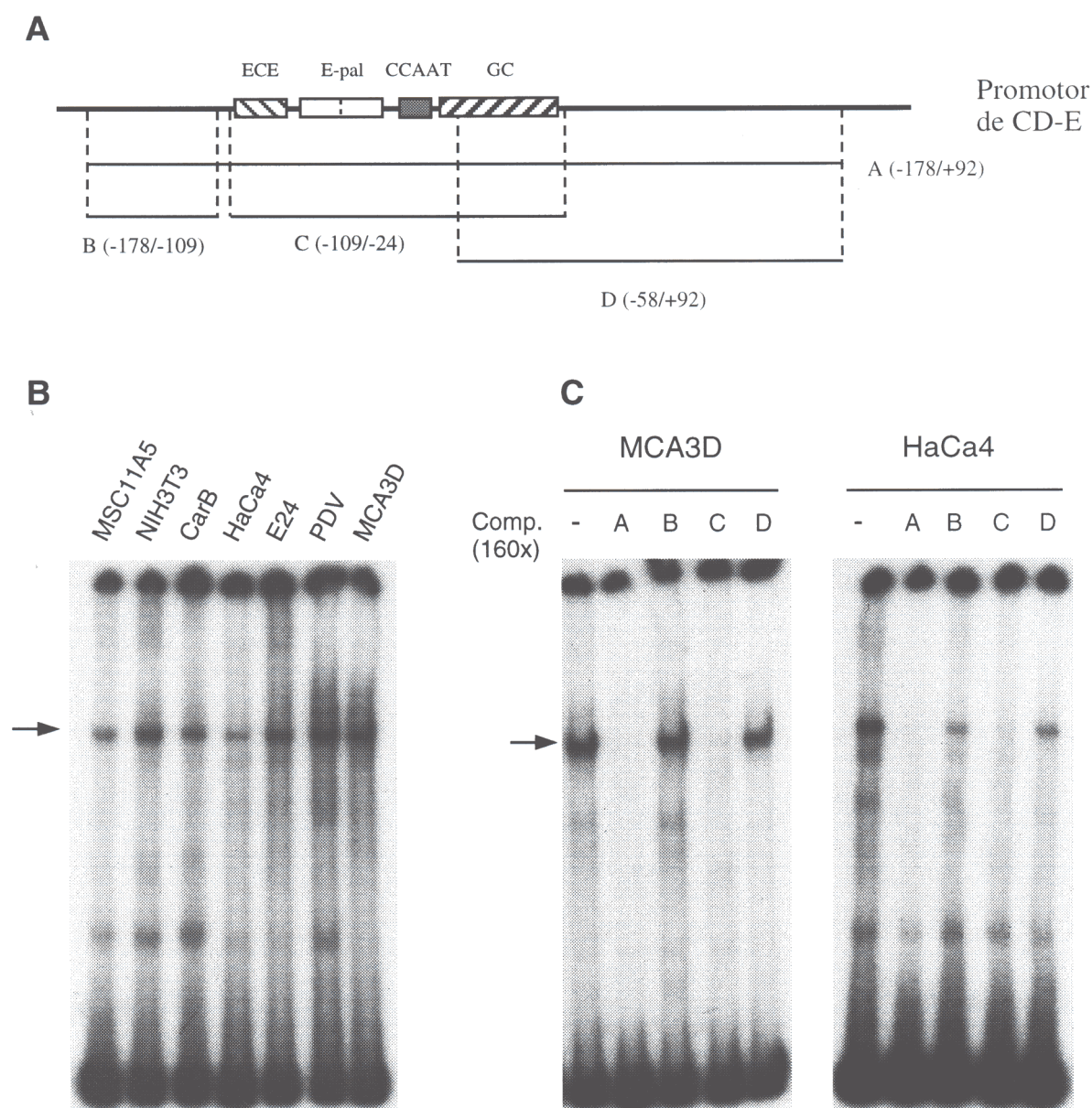


Fig. 22. Unión de factores nucleares a la región 5' proximal del promotor de CD-E.

A. Representación esquemática de los fragmentos del promotor de CD-E empleados como sonda y en los experimentos de competición.

B. Ensayos de retardo en gel empleando el fragmento A como sonda marcada y 2 μ g de extractos nucleares de las líneas indicadas. Se observa la aparición de un complejo de retardo mayoritario (indicado con una flecha) y una serie de bandas de mayor movilidad electroforética.

C. Experimentos de competición realizados en las mismas condiciones que en (B), con extractos de las líneas MCA3D y HaCa4, en ausencia (-) o presencia de un exceso 160x molar de los fragmentos indicados (Comp.).

banda de menor movilidad era mayor con los extractos de las líneas CD-E positivas MCA3D y PDV.

Se realizaron ensayos de competición de la unión con distintos fragmentos de DNA frío en exceso: fragmentos A, B, C y D, según se muestra en la figura 22A. El patrón de competición fué el mismo con extractos de todas las líneas analizadas, aunque en la figura 22C sólo se muestran los resultados obtenidos con extractos de las líneas MCA3D y HaCa4, como representantes de líneas positivas y negativas para la expresión de CD-E, respectivamente. El patrón de competición obtenido indicó que la interacción de la mayoría de los complejos proteicos es a través de la región C (-109/-24), que contiene todos los elementos reguladores previamente postulados, corroborando los datos obtenidos en los experimentos de footprinting *in vitro*. El fragmento B no compitió ninguna de las bandas de retardo. Por otro lado, el fragmento D fué capaz de competir los complejos de mayor movilidad, pero no el complejo mayoritario. La competición de los complejos minoritarios por los fragmentos C y D indicaría que probablemente estos complejos se originan por interacción con la región rica en GC. De acuerdo con esto, un exceso de un oligonucleótido que comprendía la región GC del promotor proximal de CD-E (posiciones -60/-23) era capaz de competir las mismas bandas que el fragmento D (resultados no mostrados).

Para analizar con más detalle la implicación de los diferentes elementos reguladores postulados, contenidos en la región -178/+92, se procedió a estudiar cada uno de ellos por separado.

2.2.2. Análisis de los factores que interaccionan con el elemento E-pal.

Ensayos de retardo en gel utilizando como sonda un oligonucleótido (posiciones -92/-69) que contenía el elemento E-pal (Fig. 23A) mostraron que se formaba un complejo de retardo mayoritario con extractos nucleares de todas las líneas de queratinocitos examinadas (Fig. 23B). Dicho complejo se competía específicamente por un exceso del mismo oligonucleótido frío, pero no por un oligonucleótido irrelevante (CCAAT-E). Tampoco se competía por un oligonucleótido con una doble mutación puntual en el centro del palíndromo (E-pal mut), indicando que la integridad de los dos nucleótidos centrales es necesaria para la interacción del factor/es al elemento E-pal. El oligonucleótido E-pal mut porta la misma mutación que la construcción del promotor mE-pal, que mostró mayor actividad promotora en ensayos de transfección transitoria (ver Fig. 19).

El elemento E-pal contiene dos cajas E, secuencias consenso de interacción con factores de transcripción del tipo bHLH. Los factores de la familia Myc/Max son factores de transcripción tipo bHLH que se expresan en la epidermis (ver Introducción, Apto. 5.3), lo que nos inclinó a considerarlos como posibles factores de interacción con la región E-pal. Por tanto, hicimos experimentos preliminares para testar si alguno de estos factores era capaz de modificar la actividad promotora de CD-E. Como se indica en la Tabla VIII, la cotransfección de la construcción -178 con vectores de expresión de los factores c-Myc y/o

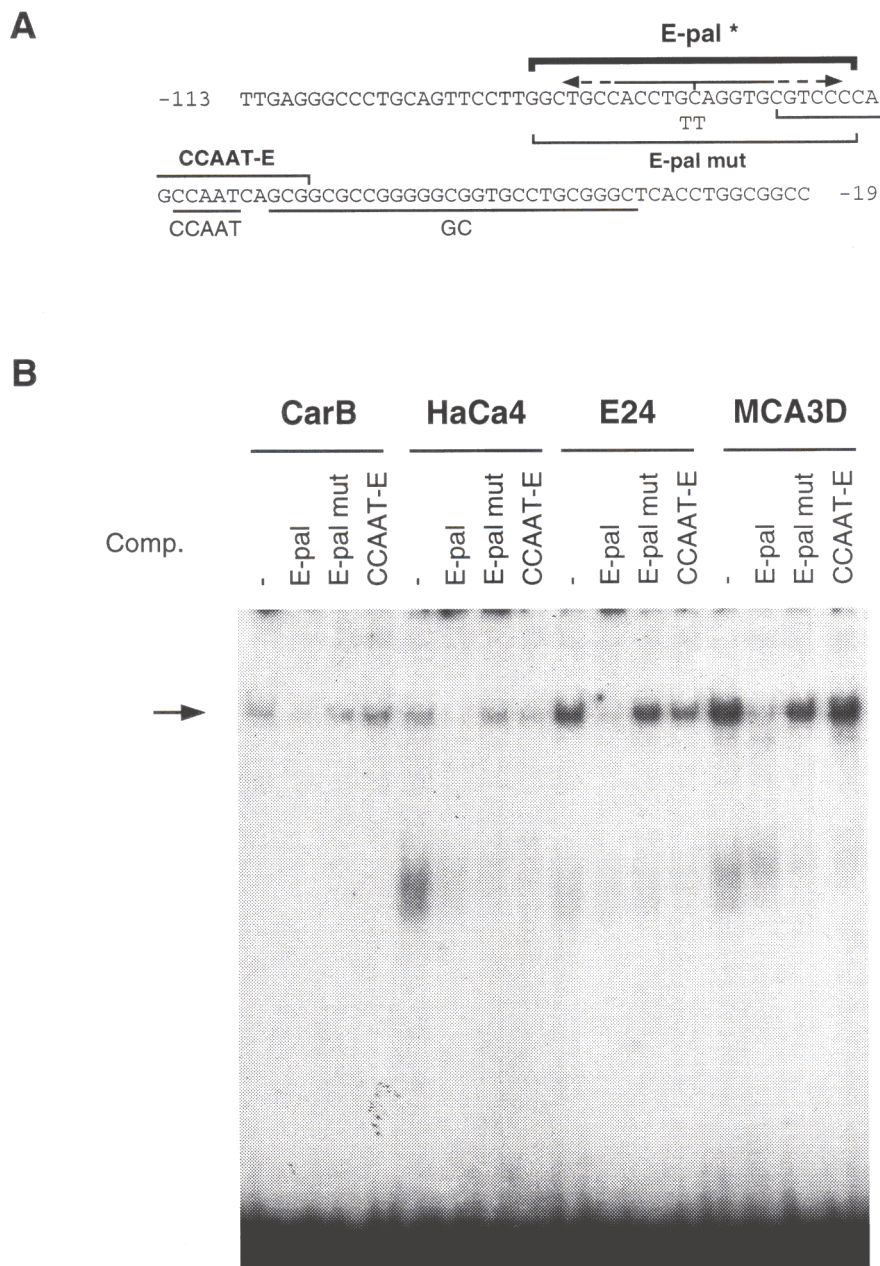


Fig. 23. Unión de factores nucleares al elemento E-pal del promotor de CD-E.

A. Región 5' proximal del gen de CD-E donde se muestran los oligonucleótidos empleados como sonda (E-pal*, corchete grueso) o como competidores (E-pal mut y CCAAT-E, corchetes finos) en los experimentos de retardo.

B. Ensayo de retardo en gel empleando 2.3 µg (CarB), 3.4 µg (HaCa4), 4.2 µg (E24) o 4.5 µg (MCA3D) de extracto nuclear de las distintas líneas en ausencia (-) o presencia de un exceso 40x (E-pal) o 100x (E-pal mut y CCAAT-E) de competidor frío (Comp.). Se observa la formación de un complejo de retardo mayoritario (indicado con una flecha) con extractos nucleares de todas las líneas analizadas.

Tabla VIII. Influencia de posibles factores de interacción con el elemento E-pal en la actividad transcripcional de la construcción -178 del promotor de CD-E.

factor *	μg	Actividad -178 (%) [#]		factor & μg		Actividad -178 (%) [#]	
		MCA3D	HaCa4			MCA3D	HaCa4
-		100	100	-		100	100
c-Myc	0.5	133	110	snail	2.5	123	104
"	2	136	110	"	5	118	67
Max	0.5	117	120	slug	2.5	129	62
"	2	136	120	"	5	284	58
c-Myc + Max	0.3+0.3	116	140				
"	1+1	139	140				

* Las cantidades de plásmido cotransfectado se igualaron completando con las cantidades necesarias de plásmido control. Los plásmidos de expresión y control empleados fueron: pHEBoMTmyc2,3, pMTmax (vectores de expresión de c-Myc y Max humano, respectivamente, bajo el control del promotor de metalotioneína) y pHEBoMT (control) (ver Materiales, Apto. 8.2.4). La expresión de c-Myc y Max se indujo con 100 mM ZnSO₄; también se trataron las células control con igual concentración de ZnSO₄.

& Las cantidades de plásmido cotransfectado se igualaron completando con las cantidades necesarias de plásmido control. Los plásmidos de expresión y control empleados fueron: CMV-sna, CMV-slug (vectores de expresión de Snail y Slug de pollo, respectivamente) y pcDNA3 (control) (ver Materiales, Apto. 8.2.4).

La actividad CAT de la construcción -178 se normalizó respecto a la de CMV-luc en cada experimento. A la actividad CAT en presencia de los vectores control se le asignó el valor de 100%.

Max en las líneas HaCa4 y MCA3D indujo un ligero aumento, aunque probablemente no significativo, en la actividad promotora de CD-E (Tabla VIII).

Por otro lado, la mitad 3' del elemento E-pal contiene también un sitio consenso de unión a factores de la familia slug/snail (Mauhin *et al.*, 1993). Por su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario, en zonas de migración de células de la cresta neural e invaginación del ectodermo para formar el mesodermo en la gastrulación (Nieto *et al.*, 1994), se ha postulado la participación de estos factores en las transiciones epitelio-mesénquima. Estas transiciones van acompañadas de pérdida de expresión de CD-E y son reminiscentes de las que ocurren en etapas avanzadas del proceso tumoral, donde también hay pérdida de marcadores epiteliales como CD-E. Por tanto, factores de la familia slug/snail podrían unirse al elemento E-pal, regulando negativamente la transcripción de CD-E.

Para investigarlo se realizaron de igual forma experimentos de cotransfección de la construcción -178 con vectores de expresión de los factores snail y slug en las líneas HaCa4 y MCA3D. Como se puede observar en la Tabla VIII estos factores no indujeron un descenso de la actividad transcripcional de CD-E en la línea MCA3D, sino más bien el factor slug (5 µg de vector de expresión) era capaz de activar la transcripción. En la línea celular HaCa4 la cotransfección de estos factores (5 µg de vector de expresión de snail y 2.5 o 5 µg de slug) indujo un ligero descenso del 40% en la actividad promotora.

2.2.3. Análisis de los factores que interaccionan con la caja CCAAT.

De la misma forma, para tratar de caracterizar el factor/es que se pudieran unir a la caja CCAAT se realizaron experimentos de retardo en gel con un oligonucleótido (posiciones -74/-56) que comprendía la región CCAAT del promotor de CD-E (Fig. 24A).

La figura 24B muestra el patrón obtenido con extractos nucleares de la línea PDV. Aparecían tres complejos de retardo que se competían específicamente por un exceso del mismo oligonucleótido frío y por oligonucleótidos que contienen los sitios consenso para los factores CP1 y CP2. Asimismo, los dos complejos de mayor movilidad (complejos 2 y 3) se competían también por un exceso de un oligonucleótido con el sitio consenso de unión a C/EBP, mientras que ninguno de los complejos era competido por un oligonucleótido con el sitio consenso para NF1. Todos estos factores (CP1, CP2, C/EBP y NF1) son factores de transcripción descritos de unión a cajas CCAAT (Chodosh *et al.*, 1988; Ryden y Beemon, 1989). Por otro lado, un oligonucleótido que contenía la caja CCAAT del promotor de la CD-P (CCAAT-P) era capaz de competir, asimismo, el complejo 1 de menor movilidad. Resultados similares se obtuvieron con extractos de CarB (no mostrados).

Estos datos sugieren que la región CCAAT del promotor de CD-E es reconocida por factores del tipo CP1, CP2 y C/EBP, tanto en las líneas CD-E positivas como CD-E negativas.



88

2.2.4. Análisis de los factores que interaccionan con la región rica en GC.

Experimentos de retardo en gel con la región rica en GC (posiciones -60/-23) del promotor de CD-E (Fig. 25A) mostraron la existencia de tres complejos capaces de interaccionar con dicho oligonucleótido. Estos tres complejos se formaban con extractos nucleares de todas las líneas celulares analizadas (CarB, HaCa4, E24, PDV y MCA3D) (Fig. 25B y datos no mostrados).

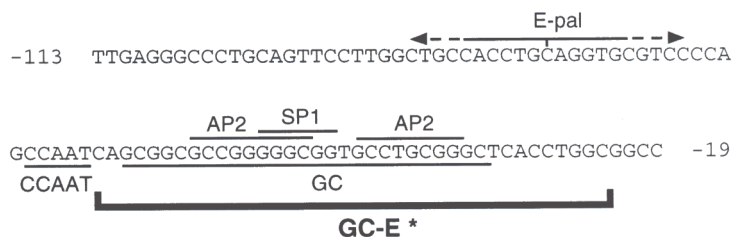
La región rica en GC del promotor de CD-E contiene dos secuencias consenso para el factor de transcripción AP2 y otra para el factor de tipo dedo de zinc, SP1 (Fig. 25A). Como una primera aproximación para identificar la naturaleza de los tres complejos de retardo, se realizaron ensayos de competición con oligonucleótidos consenso para dichos factores. Así, un oligonucleótido con la secuencia de unión a SP1 del promotor de SV40 desplazaba la unión de los complejos de retardo 1 y 2, mientras que un oligonucleótido con la secuencia de unión a AP2 del promotor de SV40 desplazaba la unión de los tres complejos formados con extractos de PDV, pero sólo el complejo 3 de movilidad intermedia formado con extractos de HaCa4 y CarB (Fig. 25B).

Por otro lado, se realizaron ensayos de competición con un oligonucleótido que contenía la región rica en GC del promotor de CD-P (GC-P), que también contiene secuencias consenso de unión a SP1 y AP2 (Faraldo y Cano, 1993). El oligonucleótido GC-P desplazaba la unión de los complejos 1 y 2 obtenidos con todos los extractos, pero no del complejo 3. El mismo comportamiento exhibía un fragmento de este oligonucleótido que contenía sólo la secuencia de unión a SP1 (SP1-P), mientras que un fragmento que contenía sólo la secuencia AP2 (AP2-P) no era capaz de desplazar ningún complejo (Fig. 25B).

Estos resultados, junto con el hecho de que la presencia de zinc era necesaria para la formación del complejo 1 (no mostrado), sugieren que probablemente SP1 sea el factor responsable de la formación de los complejos 1 y 2, mientras que el complejo 3 estaría más relacionado con AP2. Por otro lado, las diferencias observadas en el patrón de competición entre las líneas PDV y HaCa4/CarB, sugieren que los complejos 1 y 3 presentan propiedades diferentes en líneas que expresan y que no expresan CD-E.

Para confirmar la naturaleza de los factores implicados en la formación de los complejos de la región GC se realizaron experimentos de super-retardo con las líneas PDV, HaCa4 y CarB, añadiendo anticuerpos específicos a la mezcla de incubación con la sonda y los diferentes extractos nucleares. La figura 26 muestra los resultados de estos experimentos. Un anticuerpo anti-SP1 originó una clara banda de super-retardo en las tres líneas examinadas e indujo, asimismo, una disminución en la intensidad del complejo 1, y en algún caso (CarB) también del complejo 2. Por otro lado, un anticuerpo anti-AP2 generó una banda de super-retardo (HaCa4), una disminución en la intensidad del complejo 3 (PDV) o bien ambos efectos a la vez (CarB).

A



B

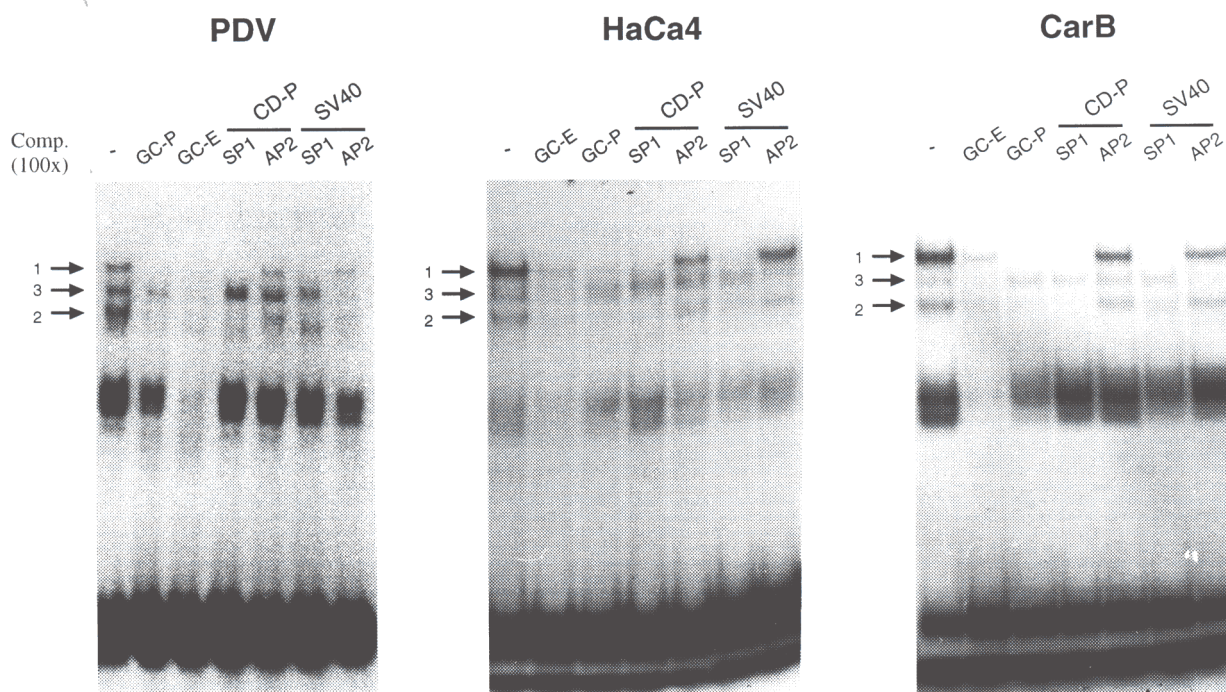


Fig. 25. Unión de factores nucleares de distintas líneas de queratinocitos de ratón a la región rica en GC del promotor de CD-E.

A. Esquema donde se muestra el oligonucleótido GC-E (GC-E *, corchete grueso) empleado como sonda en los ensayos de retardo en gel. Los sitios consenso para los factores de transcripción SP1 y AP2 también se indican.

B. Ensayos de retardo en gel utilizando la sonda GC-E y 2.5 µg de extracto nuclear de las líneas indicadas. Los tres principales complejos de retardo formados se indican con flechas (1, 2 y 3). Se empleó un exceso 100x de oligonucleótidos competidores: GC-P (región rica en GC del promotor de CD-P), GC-E (sonda fría) y oligonucleótidos que contenían los sitios consenso de unión a SP1 y AP2 de la región rica en GC del promotor de CD-P y del promotor de SV40 (ver Materiales, Apto. 9.2). (-), ausencia de competidor.

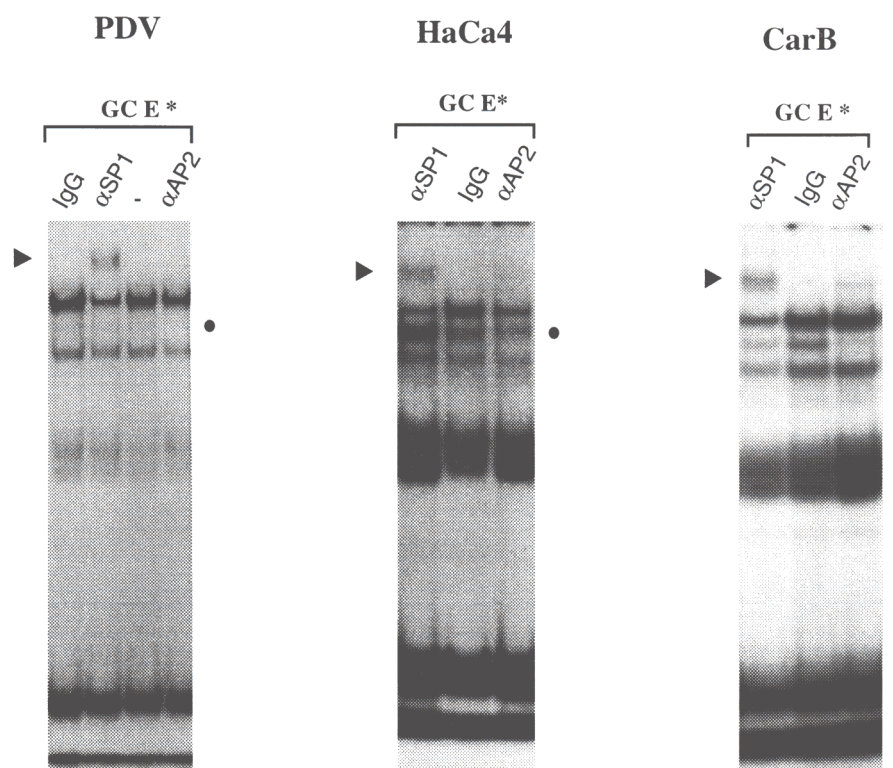


Fig. 26. Factores tipo SP1 y AP2 de los queratinocitos de ratón interaccionan con la región rica en GC del promotor de CD-E. El oligonucleótido GC-E (ver Fig. 25) se empleó como sonda en experimentos de super-retardo. La sonda se incubó con 2.5 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas, en ausencia (-) o presencia de 1.5 μ g de anticuerpo anti-SP1 (α SP1), anti-AP2 (α AP2) o IgG de conejo (IgG) como control. Las bandas de super-retardo se indican con una punta de flecha y la desaparición parcial del complejo 3 con un punto.

Estos datos permiten confirmar la participación de factores de transcripción del tipo SP1 y AP2 en la formación de complejos de interacción con la región GC de CD-E en las líneas de queratinocitos analizadas.

Evidencias adicionales acerca de la implicación de los factores SP1 y AP2 en el reconocimiento de la región rica en GC se obtuvieron por experimentos de footprinting *in vitro* de la región 5' proximal de CD-E utilizando los factores de transcripción puros SP1 y AP2. Como se puede ver en la figura 27, en efecto, dichos factores eran capaces de interaccionar con la región rica en GC del promotor de CD-E.

Por otra parte, y para determinar si la unión del factor AP2 tiene una consecuencia funcional en la actividad promotora, se realizaron experimentos de cotransfección con un vector de expresión de una forma truncada del factor AP2 (AP2- Δ TA), que carece del dominio de transactivación y actúa como dominante negativo (Hennig *et al.*, 1996). Como se muestra en la tabla IX esta forma truncada de AP2 fué capaz de reprimir, de forma dependiente de dosis, la actividad promotora de la construcción -178 (un 70% con 5 μ g de AP2- Δ TA), pero no de forma significativa la de la construcción -21. Estos resultados, junto con los valores de actividad promotora de los mutantes mut GC1 y mut GC2 (ver Fig. 20), apoyan que la región GC, que contiene sitios de unión a SP1 y AP2, está jugando un papel positivo en la regulación de la transcripción de CD-E.

Tabla IX. Un dominante negativo de AP2 suprime parcialmente la actividad promotora de CD-E en MCA3D.

Δ AP2*	% Actividad # (MCA3D)		
	-178		-21
μ g			
-	100		100
1	72	56	82
5	28	28	73

* Se cotransfectaron 1 o 5 μ g del vector dominante negativo de AP2 (AP2- Δ TA), completando en el primer caso hasta 5 μ g con la cantidad necesaria del vector control RSV-0 (ver Materiales. Apto. 8.2.4).

La actividad CAT de la construcción -178 o -21 en la línea celular MCA3D se normalizó respecto a la actividad de CMV-luc. A la actividad de dichas construcciones en presencia del vector control y en ausencia de AP2- Δ TA se le otorgó el valor de 100%. Para la construcción -178 se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

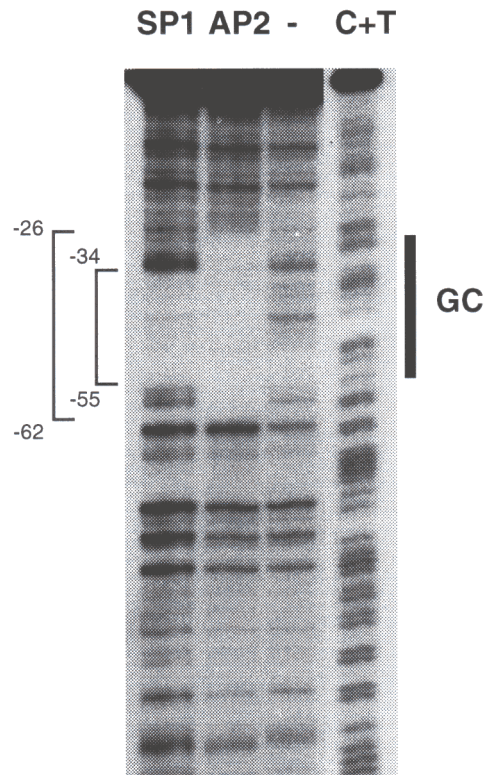


Fig. 27. Interacción de los factores SP1 y AP2 con la región rica en GC de la zona 5' proximal del gen de CD-E. Los factores recombinantes puros SP1 y AP2 (1fpu) se incubaron con la sonda -178/+17 del promotor de CD-E marcada en el extremo 3' de la cadena no codificante, se digirieron con DNAasaI y se analizaron en gel de secuenciación. (-), control de DNA digerido en ausencia de factor de transcripción. C+T, productos de la reacción de secuenciación G+A de Maxam-Gilbert sobre la sonda. Las bandas corresponden, por tanto, con las C y T de la cadena codificante. Las regiones protegidas por SP1 (-55/-34) y AP2 (-62/-26) se indican con corchetes a la izquierda y corresponden con la región rica en GC, señalada con una barra gruesa a la derecha.

2.2.5. Análisis de los factores que interaccionan con la región ECE

En experimentos de footprinting *in vitro* la región ECE, comprendida entre los nucleótidos -108/-86 aproximadamente, se protegía sólo con extractos nucleares de líneas que expresaban CD-E (ver Fig. 21). Los potenciales factores implicados en el reconocimiento de esta región se analizaron mediante ensayos de retardo en gel utilizando como sonda el oligonucleótido ECE (posiciones -111/-83) que aparece en la figura 28A, tanto en líneas positivas como negativas para CD-E. Como se puede observar, esta región, que también es rica en GC, contiene secuencias consenso de unión a factores de la familia Ets (Wasylyk *et al.*, 1993) y la secuencia CRE (elemento de respuesta a AMPc) de unión a factores CREB/ATF (Hoeffler *et al.*, 1988; Benbrook y Jones, 1994).

La figura 28B muestra que se formaron dos complejos de retardo mayoritarios (1 y 2), y una serie de complejos de menor intensidad y mayor movilidad electroforética. De forma interesante, la intensidad del complejo 2 formado en presencia de extractos nucleares de líneas que expresaban CD-E (E24 y sobre todo MCA3D y PDV) era mucho mayor que la del formado con extractos de líneas CD-E negativas. Así, con extractos de fibroblastos NIH3T3 o de la línea derivada de carcinoma MSC11A5 la intensidad del complejo 2 disminuía hasta llegar a igualar en intensidad al complejo 1, siendo el complejo 2 apenas detectable en extractos de CarB.

Estudios de competición de los complejos de retardo sugirieron la participación de algún miembro de la familia Ets en la interacción. Así en la figura 28C se observa que el oligonucleótido PEA 3, que porta un sitio consenso para el factor PEA 3, era capaz de competir una de las bandas de movilidad intermedia (complejo 3), mientras que el mismo oligonucleótido con una mutación en el sitio consenso no competía dicha banda de retardo. Se ha descrito que la mayoría de los miembros de la familia Ets se unen al motivo PEA 3 (MacLeod *et al.*, 1992). Sin embargo, los complejos mayoritarios 1 y 2 no se competían por PEA 3. El mismo patrón de competición se observó en una línea CD-E positiva (E24) y en una línea CD-E negativa (HaCa4).

Para determinar de forma más clara el lugar de interacción de las proteínas nucleares con el DNA y la posible participación de factores de la familia Ets y/o de factores tipo CREB en el reconocimiento de la región ECE, se realizaron análisis de retardo en gel compitiendo con el oligonucleótido ECE mutado en distintas posiciones (ver Fig. 29A). Así, se hicieron competiciones con el oligonucleótido ECE portando mutaciones en cada uno de los sitios Ets independientemente (mA y mB) o en combinación (mAB), y en el sitio CREB (mC).

Los resultados, que aparecen en la figura 29B, indican que la integridad del sitio Ets situado más en 3' (Ets-A) es necesaria para la interacción del factor o factores nucleares con la región ECE, ya que los oligonucleótidos mA y mAB, con el sitio Ets-A mutado, eran incapaces de desplazar la unión. En cambio, los oligonucleótidos mB y mC desplazaban la unión de igual forma que el oligonucleótido ECE silvestre. El patrón de competición era similar en todas las líneas analizadas (MCA3D, HaCa4 y CarB) con la única diferencia de

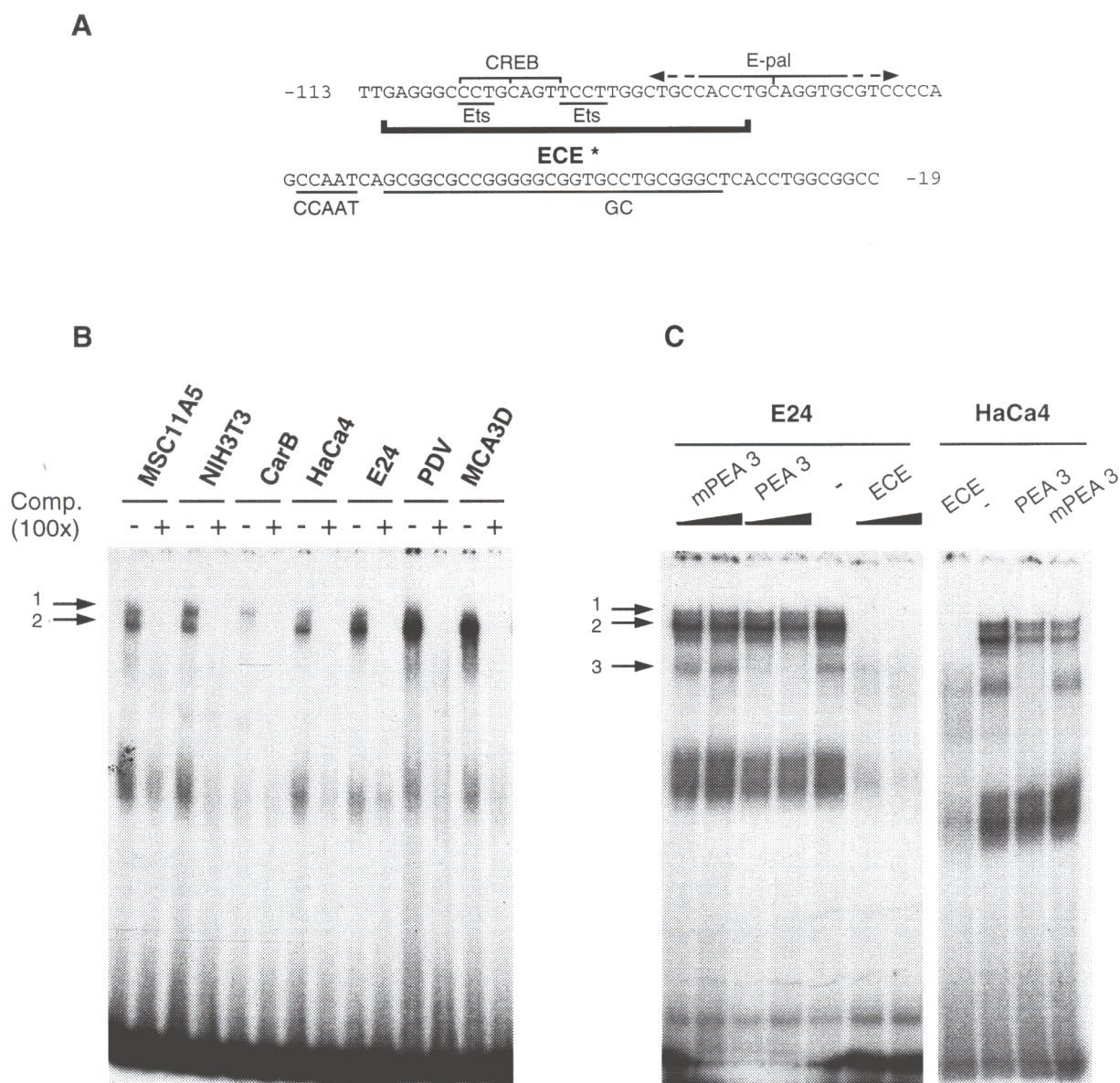


Fig. 28. Interacción de factores nucleares de las líneas de queratinocitos de ratón con la región ECE

A. Esquema donde se señala el oligonucleótido ECE empleado como sonda (ECE *, corchete grueso) y los sitios consenso Ets y CREB de esta región.

B. Ensayos de retardo en gel con la sonda ECE y 10 µg de extracto nuclear de las líneas indicadas. Los dos principales complejos de retardo formados se indican con flechas (1 y 2).

C. Ensayos de competición en ausencia (-) o presencia de un exceso 100x y 250x (E24), 100x (ECE en HaCa4) o 150x (PEA 3 y mPEA 3 en HaCa4), de los oligonucleótidos indicados. Los oligonucleótidos PEA 3 y mPEA 3 contienen el sitio consenso, silvestre y mutado respectivamente, de unión al factor de la familia Ets PEA 3 (ver Materiales, Apto. 9.2). El complejo 3, indicado con una flecha, se compete con el oligonucleótido PEA 3 pero no con mPEA 3.

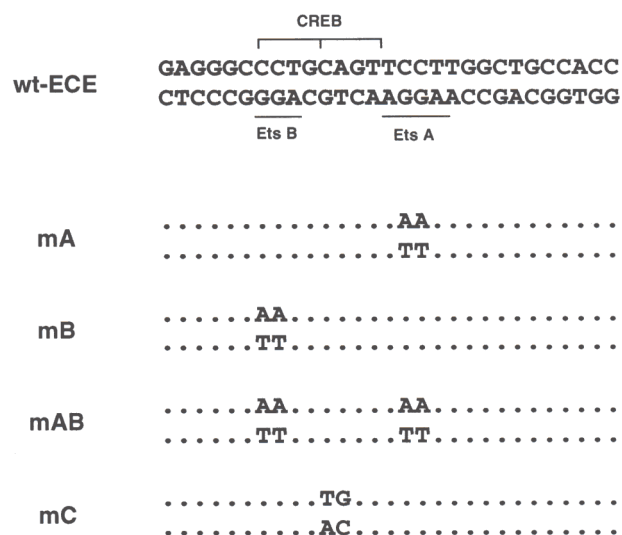
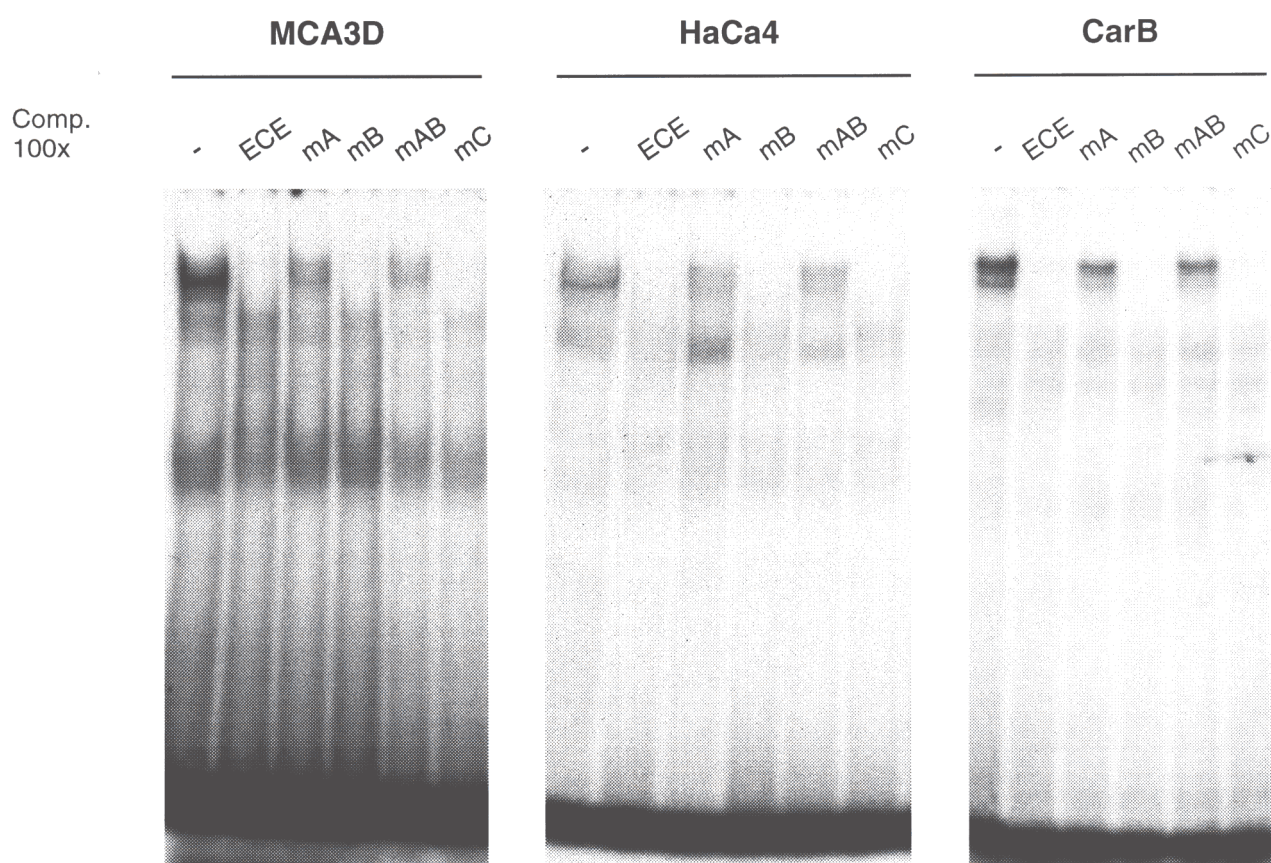
A**B**

Fig. 29. La interacción de factores nucleares a la región ECE se realiza principalmente a través del sitio Ets-A.

A. Esquema del oligonucleótido ECE empleado como sonda y de los oligonucleótidos mutados en los sitios consenso empleados en los ensayos de competición.

B. Patrón de competición de la unión a ECE de 10 µg de extracto nuclear de las líneas indicadas con un exceso 100x de los oligonucleótidos que se indican. (-), ausencia de competidor. La mutación en el sitio Ets-A induce un descenso total o parcial de la capacidad de competir la unión.

que los oligonucleótidos mA y mAB eran capaces de competir parcialmente los complejos formados con extractos nucleares de MCA3D (CD-E positiva). Estos resultados sugieren además la existencia de diferencias o modificaciones en los factores que reconocen la región ECE en líneas que expresan y no expresan CD-E.

2.3. Análisis funcional de la región ECE y del elemento Ets en la actividad promotora de CD-E.

La región ECE, como se mencionó anteriormente, contiene, además de los sitios Ets, un consenso casi perfecto de unión a factores de tipo CREB de respuesta a AMPc. Para determinar si factores de esta familia pudieran regular la actividad transcripcional de CD-E en las líneas de queratinocitos de ratón, se midió la actividad del promotor en células estimuladas con forskolina, un agente inductor de AMPc. Los resultados, que aparecen en la Tabla X, mostraron que este agente no modificó de forma sustancial la actividad promotora de la construcción -178. El ligero incremento observado también se apreció en algunas ocasiones con la construcción -78, que carece del sitio CREB. Estos resultados, junto a la ausencia de efecto de la mutación en el sitio CREB en los experimentos de retardo en gel (ver Fig. 29), sugieren que el sitio CREB de la región ECE no estaría ejerciendo un papel regulador de la actividad del promotor de CD-E en las líneas analizadas.

Por otro lado, y para determinar si el sitio Ets-A, necesario para la interacción de factores proteicos, era funcional, se realizaron ensayos de transfección transitoria utilizando una construcción del promotor de CD-E (nucleótidos -178/+92) que portaba una mutación en el sitio Ets-A (construcción m-Ets) (Fig. 30). Como puede observarse, la construcción mutada mostró una actividad transcripcional alrededor de 2 veces mayor respecto a la actividad de la construcción silvestre en las líneas CD-E positivas MCA3D y PDV. En cambio, en líneas CD-E negativas (CarB y Haca4), las construcciones silvestre y mutada mostraron niveles similares de actividad. Estos resultados sugieren que el elemento Ets jugaría un moderado papel regulador negativo en líneas que expresan CD-E. En líneas que no expresan este elemento podría no desempeñar ningún papel regulador, o bien podría estar enmascarado por el fuerte papel represor del elemento E-pal en dichas líneas.

Por tanto, si este sitio Ets es funcional, la cotransfección del promotor de CD-E con vectores de expresión de factores de la familia Ets debería inducir un cambio en la actividad transcripcional. Para comprobarlo se realizaron experimentos de cotransfección con vectores de expresión de c-Ets-1 (pollo) y ERM (humano). Los efectos sobre la actividad transcripcional fueron más significativos con el factor ERM, y son los que se muestran en la figura 31. La sobreexpresión de este factor indujo un aumento de 2.3 y 3.6 veces en la actividad del promotor de CD-E en las líneas MCA3D y HaCa4, respectivamente (Fig.31A). El efecto estimulador del factor ERM en la línea MCA3D parece ejercerse a través del sitio

Tabla X. Influencia de la forskolina en la actividad transcripcional de CD-E.

Línea celular	FK # (μ M)	Actividad * +FK/-FK	
		-178	-78
MCA3D	12	1.25	1.40
PDV	12	1.35	1.12
PDV	40	1.35	0.78
HaCa4	12	1.35	0.84

* La actividad CAT de las construcciones -178 o -78 se normalizó en cada experimento respecto a la actividad de CMV-luc. Los valores de actividad de dichas construcciones en presencia de forskolina (+FK) se relacionó con los valores de actividad en ausencia de la misma (-FK).

La FK se añadió a las células en cultivo después de la transfección y se mantuvo durante 22 horas, hasta recoger los extractos para medir actividad.

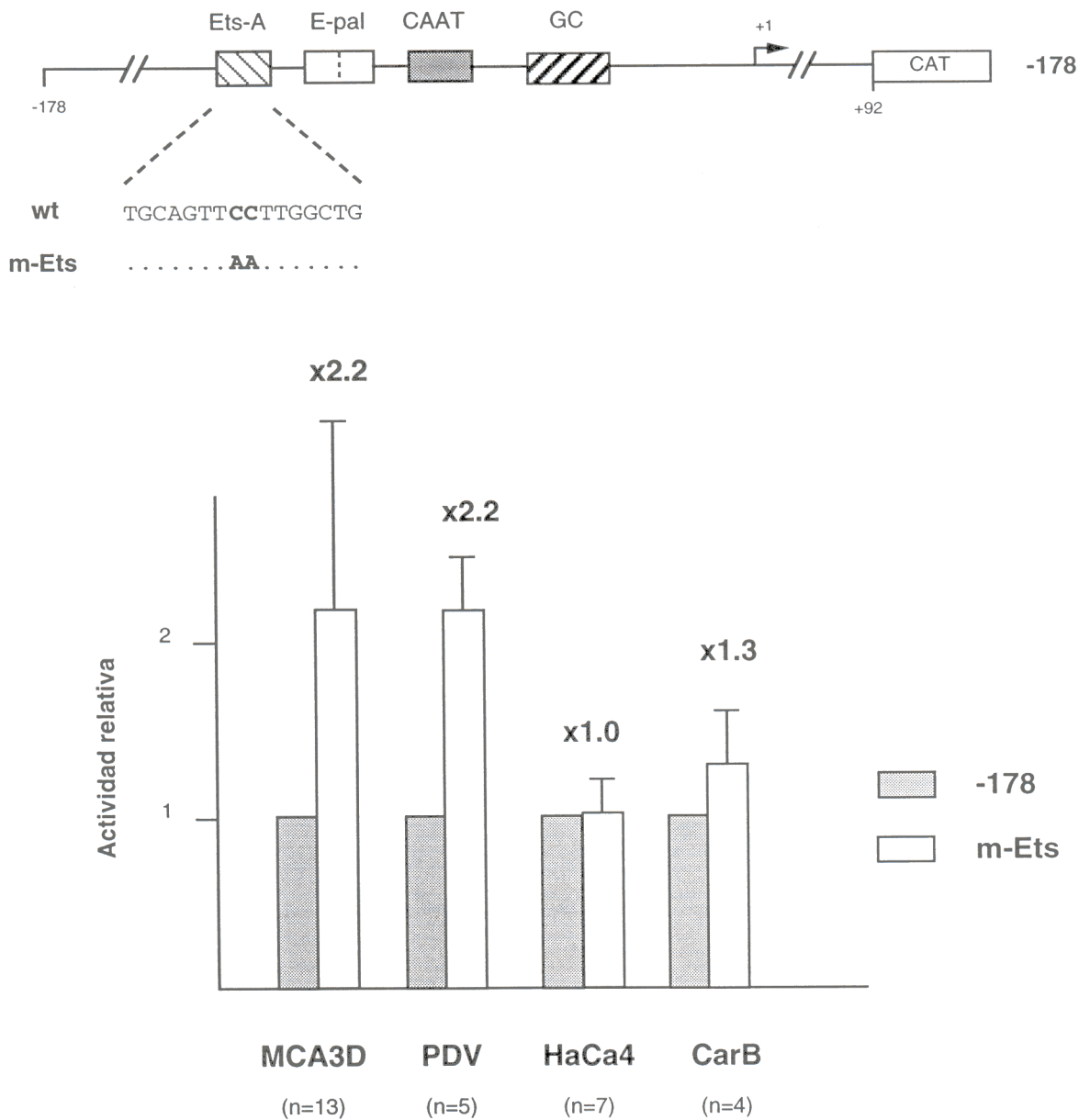


Fig. 30. La mutación del sitio Ets-A induce un aumento en la actividad promotora de CD-E en líneas de queratinocitos que expresan CD-E. Los valores de actividad CAT de la construcción -178 (w.t.) o de la misma construcción mutada en el sitio Ets-A, m-Ets (parte superior de la figura), se normalizaron en cada experimento respecto a la actividad de CMV-luc. La actividad de la construcción m-Ets en cada línea celular se indica como actividad relativa respecto a la actividad de -178. Los valores representan la media de n experimentos y las desviaciones standard se muestran como barras de error. Los números sobre las barras representan la inducción en la actividad promotora que provoca la mutación.

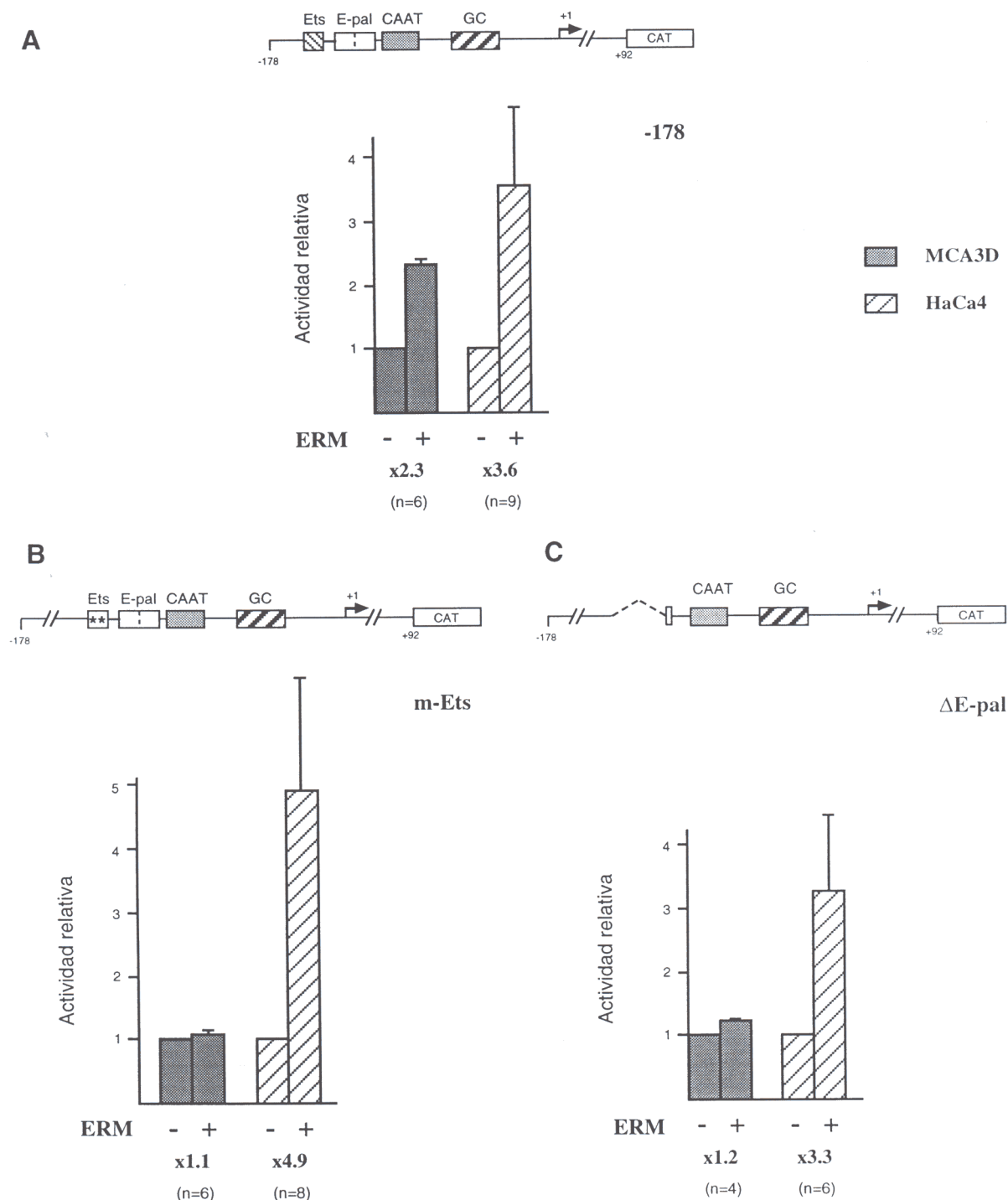


Fig. 31. La cotransfección de ERM induce un incremento en la actividad transcripcional del promotor de CD-E. Las construcciones del promotor de CD-E -178 (Panel A), m-Ets (Panel B) o ΔE-pal (Panel C) se cotransfectaron con 1 μg del vector de expresión de ERM, pSG5-ERM, (+) o del vector control pSG5 (-) (ver Materiales, aptdo. 8.2.4), en las líneas celulares MCA3D (columnas grises) o HaCa4 (columnas rayadas). La actividad CAT se normalizó en cada experimento con la de CMV-luc. Los valores de actividad en presencia de ERM se relacionaron con los valores en ausencia de ERM (vector control) al que se dió el valor de uno, en cada experimento. n, número de experimentos. Los valores corresponden a la media de los valores de los experimentos indicados y las barras de error indican las desviaciones standard. El valor que aparece bajo la barra de abscisas indica el número de veces de inducción en la actividad promotora que provoca el factor ERM.

Ets-A, ya que cuando la construcción que se cotransfectó en esta línea fué la construcción m-Ets, la sobreexpresión de ERM no indujo ningún cambio en la actividad transcripcional del promotor de CD-E (Fig. 31B). En cambio, en la línea celular HaCa4 la estimulación por ERM debe efectuarse por mecanismos distintos a la interacción con el sitio Ets-A, ya que la mutación en este sitio no alteró el efecto inductor de ERM. Resultados similares se obtuvieron con la construcción Δ E-pal, que también carece del sitio Ets y del elemento palindrómico E-pal (Fig. 31C).

Para estudiar la presencia endógena de miembros de la familia Ets en estas líneas, y si existía alguna diferencia, en los niveles de expresión o en el tipo de factor expresado, que pudiera dar cuenta del distinto comportamiento exhibido por líneas positivas y negativas, se realizaron ensayos de inmunoblot con un anticuerpo que reconocía distintos miembros de la familia Ets, como primera aproximación. Como se puede ver en la figura 32, todas las líneas analizadas expresaban algún miembro de esta familia, y no se observaron diferencias entre ellas. Sin embargo, ya que el anticuerpo es de amplio espectro, estos resultados no permiten descartar una expresión diferencial, cuantitativa o cualitativa, de miembros de la familia Ets en las diferentes líneas celulares.

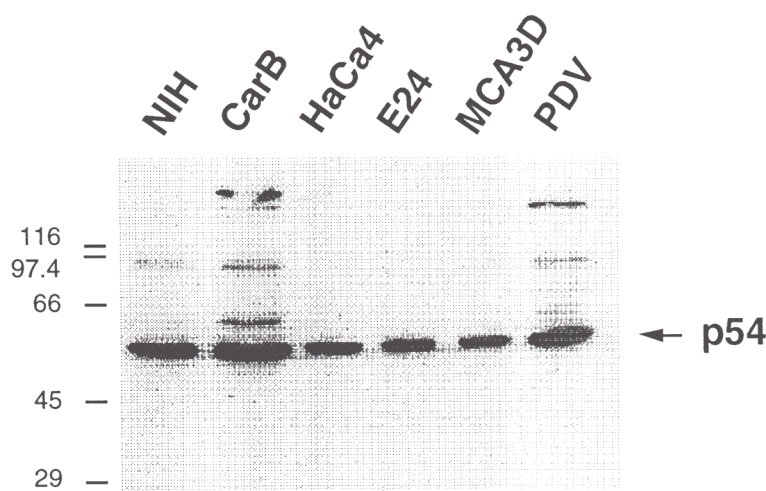


Fig. 32. Detección de factores de la familia Ets por inmunoblot en las distintas líneas de queratinocitos de ratón. 10 μ g de extracto total de las líneas celulares indicadas se sometieron a inmunoblot con un anticuerpo anti-EtsI que reconoce varios miembros de la familia Ets. La banda específica de 54 KDa se indica a la derecha con una flecha. A la izquierda se señalan los marcadores de peso molecular en KDa.

2.4. Estudios del promotor endógeno de CD-E.

2.4.1. Estado de metilación endógena del promotor de CD-E.

Los ensayos de transfección transitoria con el promotor exógeno de CD-E mostraron la existencia de una serie de factores capaces de regular la expresión de CD-E y que actúan en trans, algunos de los cuales pueden estar alterados durante la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón. Sin embargo, estudios previos en líneas de carcinomas humanos han sugerido que la metilación endógena de la región 5' del gen de CD-E en islas CpG es uno de los mecanismos implicados en la represión de su expresión (Graff *et al.*, 1995; Yoshiura *et al.*, 1995).

Para analizar si la pérdida de expresión de CD-E durante la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón pudiera estar también relacionada con mecanismos de represión transcripcional por metilación, decidimos estudiar el estado de metilación endógena del promotor de CD-E en las distintas líneas de queratinocitos de ratón. Para ello se realizaron análisis de Shouthern-blot sobre DNA genómico aislado de las distintas líneas celulares, digerido con BamHI, y sometido a una segunda digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación. La sonda que se utilizó correspondía a la región 5' del gen de CD-E (-800/+92) (Fig. 33A).

La figura 33B muestra cómo la digestión del DNA con BamHI originó una banda de aproximadamente 6 Kb en la región promotora de CD-E. En la líneas celulares MSC11A5 y HaCa4 aparece una banda adicional con un tamaño correspondiente a 4.1 Kb. Esta banda sugiere la existencia de alguna alteración o polimorfismo en alguna de las copias del gen de CD-E, en la región 5', en estas dos líneas celulares.

El enzima HaeII es un enzima sensible a metilación. Según se muestra en la figura 33A, la digestión con HaeII debería originar, en DNAs no metilados, la desaparición de la banda de 6 Kb y la aparición de dos bandas menores. En la parte B de la figura 33 se puede observar cómo la digestión con HaeII no modificó el tamaño de la banda de 6 Kb, que se mantuvo en el DNA de todas las líneas estudiadas, tanto DNA de líneas que expresan CD-E (MCA3D, PDV y E24) como de líneas que no la expresan (HaCa4, CarB y MSC11A5). En el carril correspondiente a HaCa4 se puede observar la aparición de una banda de unas 1.8 Kb tras la digestión con BamHI y HaeII. Sin embargo lo más probable es que esta banda se origine a partir de la adicional de 4.1 Kb, ya que ésta desaparecía tras la digestión con HaeII. En la línea celular MSC11A5, que también presentaba la banda de 4.1 Kb, no se apreció la banda de 1.8 Kb, pero esto puede deberse a la poca intensidad que posee en general este carril, puesto que la banda de 4.1 Kb sí desaparecía tras la digestión con HaeII en esta línea celular. Estos resultados sugieren que la banda anómala de 4.1 Kb que aparece en HaCa4 y MSC11A5 porta al menos un sitio HaeII que no está metilado, mientras que el sitio HaeII del promotor endógeno de CD-E en la posición -56 estaría metilado en todas las líneas celulares.

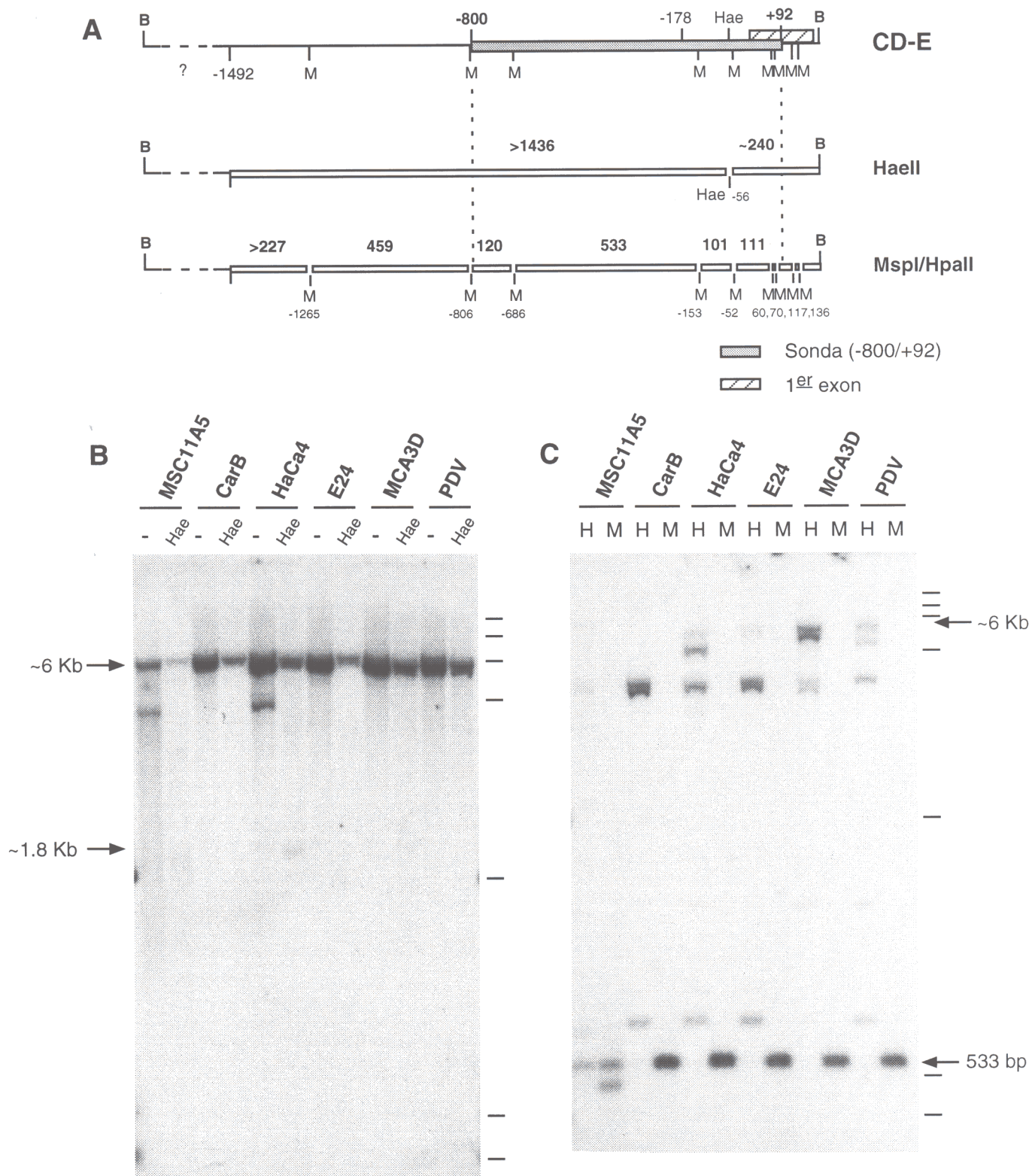


Fig. 33. Estudio del estado endógeno de metilación del promotor de CD-E por Southern-blot.

A. Representación esquemática y mapa de restricción de la región 5' del gen de CD-E, donde se indican las dianas de restricción conocidas de BamHI (B), HaeII (Hae) y MspI/HpaII (M). El fragmento empleado como sonda se representa con un rectángulo gris y la región correspondiente al primer exón con un rectángulo rayado. En la parte inferior se indican los tamaños de los fragmentos de DNA que resultarían de la digestión total con las enzimas señaladas.

B y C. Southern-blot del DNA de las líneas indicadas, digerido con BamHI solamente (-) o BamHI y HaeII (Hae), parte B; o bien con BamHI junto con MspI (M) o con HpaII (H), parte C. Se empleó la sonda correspondiente a la región -800/+92 del promotor de CD-E indicada en la parte A de la figura. Las pequeñas barras a la derecha corresponden con los marcadores de peso molecular de 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 1.6, 0.51 y 0.39 Kb.

Para confirmar la existencia de metilaciones en la región promotora del gen de CD-E se realizaron también ensayos de Southern-blot digiriendo con la enzima sensible a metilación HpaII, y comparando con el patrón generado por su isoesquizómero MspI, que reconoce la misma diana de restricción pero no es sensible a metilación. Tal como se muestra en el esquema de la figura 33A, en la región promotora de CD-E reconocida por la sonda empleada (-800/+92) la digestión con MspI debe cortar el DNA en pequeños fragmentos, siendo el mayor de 533 bp. En la figura 33C se observa en los carriles correspondientes a la digestión con MspI esta banda de 533 bp. En el carril correspondiente a MSC11A5 se observó adicionalmente otra banda de unos 490 bp, lo que reafirma la existencia de alteraciones o polimorfismos en la región del promotor de CD-E en esta línea celular.

La digestión con HpaII debería originar el mismo patrón si el DNA no estuviera metilado en ninguno de los sitios de corte HpaII de la región promotora. En caso contrario, se originarían bandas de mayor tamaño. Los resultados obtenidos correspondían con esta segunda opción, ya que en ningún caso, salvo en el DNA de MSC11A5, aparecía la banda de 533 bp, sino bandas mayores correspondientes a digestiones parciales con HpaII, llegando incluso a aparecer la banda de 6 Kb, correspondiente al fragmento BamHI sin digerir. En el caso de la línea celular MSC11A5 sí aparecía tras la digestión con BamHI y HpaII una banda de un tamaño que podría corresponder con 533 bp. Sin embargo, aparecían también bandas de mayor tamaño y la banda de 6 Kb (que se aprecian bien en la autorradiografía original), indicando que también el promotor endógeno está metilado en esta línea, aunque no se puede descartar que sea en posiciones diferentes a las del resto de líneas estudiadas.

Estos resultados indican que la región 5' del gen de CD-E está metilada endógenamente en todas las líneas de queratinocitos analizadas. Al menos la posición -685 o la posición -152 del promotor de CD-E, sitios HpaII/MspI (flanqueantes a la banda de 533 bp), están metiladas en todas las líneas, salvo en la línea indiferenciada MSC11A5, donde no se ha podido demostrar de forma concluyente. También la posición -56 (sitio HaeII) está metilada de forma endógena en todas las líneas de queratinocitos analizadas. Por otra parte, estos resultados no descartan la existencia de metilaciones en otras regiones con islas CpG del promotor.

Por tanto, en este sistema celular no se puede atribuir la pérdida de expresión de CD-E durante la progresión a mecanismos de hipermetilación de su región promotora, ya que esta región se encuentra metilada tanto en líneas que expresan CD-E como en líneas que no la expresan.

2.4.2. Estudios de footprinting in vivo.

Todas las evidencias indicaban que al menos uno de los mecanismos de la pérdida de expresión de CD-E en el sistema de la carcinogénesis de piel de ratón era las alteraciones de factores que actúan en trans sobre el promotor de CD-E (factores de transcripción, sus

cofactores, o señales que conducen a la puesta en marcha de un programa transcripcional), pero que en último término actuarían por interacción con la región 5' promotora del gen de CD-E. Para confirmar esta hipótesis y detectar si los elementos reguladores postulados mediante experimentos *in vitro* y de transfección transitoria estaban realmente ejerciendo un papel regulador, decidimos analizar el estado de ocupación y la estructura del promotor endógeno mediante experimentos de footprinting *in vivo*.

Las células en cultivo se trataron con el agente metilante DMS, que metila *in vivo* los residuos de DNA no protegidos. El DNA se digirió con piperidina, en los residuos metilados, se amplificó y marcó con cebadores específicos para la región promotora de CD-E, tal como se indica en Métodos, Aptdo. 12. De esta forma, y por comparación con un DNA control metilado *in vitro* (Co), se pudieron detectar los residuos protegidos o hipersensibles indicativos de diferente estructuración del DNA en líneas que expresan y no expresan CD-E. La figura 34A muestra los resultados obtenidos con la cadena codificante del promotor de CD-E en las líneas celulares MCA3D (CD-E positiva) y CarB (CD-E negativa). Los resultados obtenidos con la cadena no codificante se muestran en la figura 34B, incluyendo además las líneas HaCa4 (CD-E negativa) y E24 (CD-E positiva). En la figura 35 se muestra un esquema donde se recogen todos los sitios hipersensibles (triángulos opacos) o protegidos (triángulos punteados) *in vivo* del promotor de CD-E, en las líneas celulares MCA3D y CarB.

En la línea celular CarB, que no expresa CD-E, sólo aparecían protegidas las posiciones -80, en el centro del palíndromo E-pal, y la posición -101, próxima al sitio Ets de la región ECE. (Fig. 34 y 35).

En la línea celular MCA3D, por el contrario, aparecían numerosos sitios de protección o hipersensibilidad, sugiriendo una configuración del promotor mucho más abierta, que probablemente refleje un estado transcripcional más activo (Fig. 34 y 35). Así, muchos de los sitios de regulación postulados mostraron modificaciones, en comparación con un DNA control metilado *in vitro*. Especialmente en la región rica en GC, con protecciones en los sitios SP1 y AP2 y sitios hipersensibles en los bordes de esta región; en la caja CCAAT; en el elemento E-pal; y en los bordes de la región ECE. Asimismo, aparecía un sitio de hipersensibilidad en el sitio de inicio de la transcripción +1, y sitios protegidos e hipersensibles en posiciones muy cercanas, indicando que probablemente la RNA polimerasa II esté actuando, unida al promotor, en esta línea celular. Por otro lado, en MCA3D se observaron posiciones adicionales potencialmente importantes como los sitios de hipersensibilidad en -139 y -16, y las protecciones de las posiciones -167/-169 y -126/-117, situadas en regiones ricas en GC. Estas regiones ricas en GC, que contienen sitios consenso de unión a los factores de transcripción SP1 y Ets, podrían ser importantes para la actividad transcripcional de CD-E.

El patrón obtenido en los análisis de footprinting *in vivo* con la línea celular PDV, que expresa CD-E, fué prácticamente igual al obtenido con la línea MCA3D (resultados no

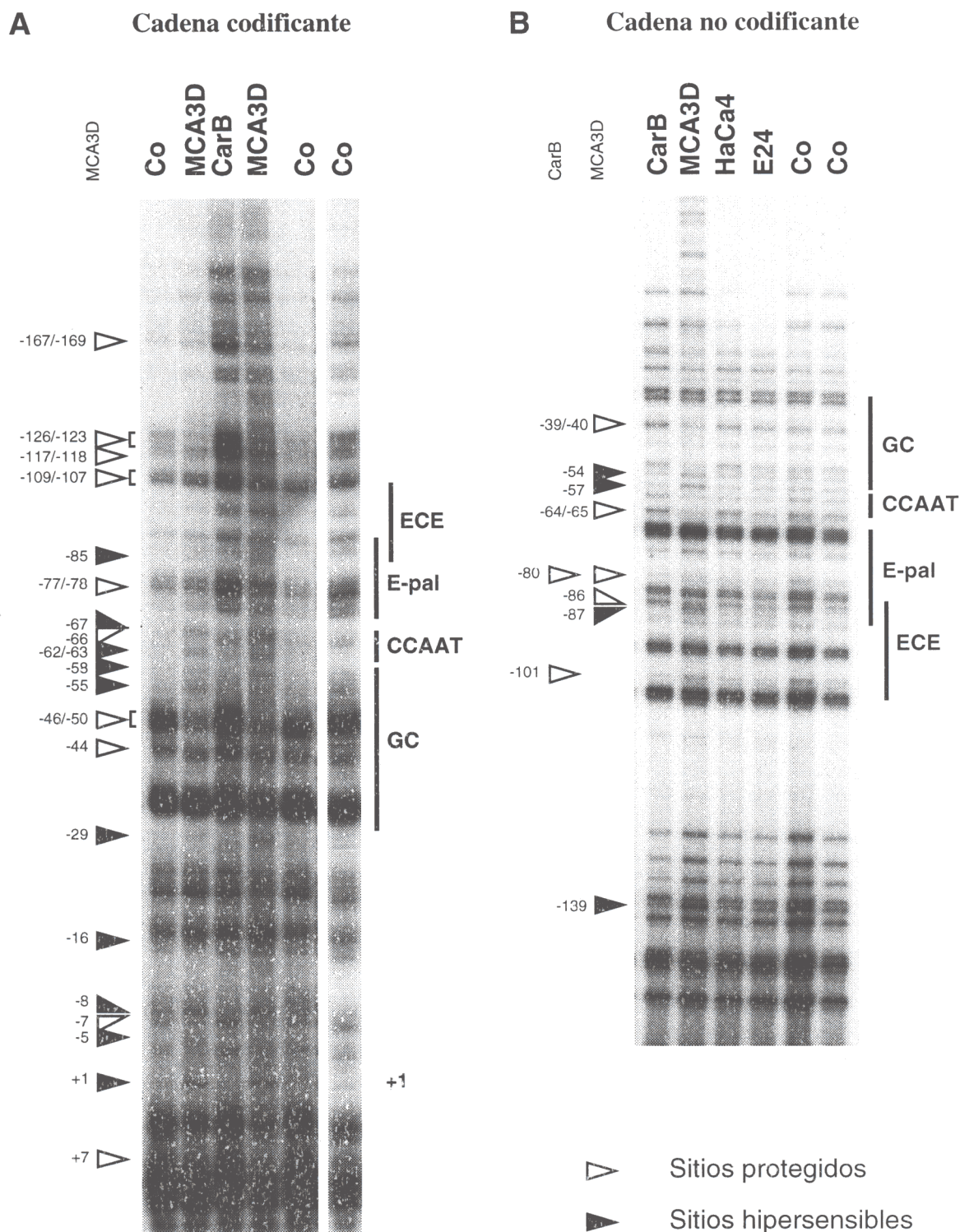


Fig. 34. Análisis por footprinting *in vivo* del promotor de CD-E en líneas de queratinocitos de ratón. Las células en cultivo se metilaron *in vivo* con DMS y el DNA se digirió con piperidina en los residuos metilados. Se emplearon los oligonucleótidos cebadores adecuados (ver Materiales, Apto. 9.3) para amplificar y marcar la cadena codificante (A) o la cadena no codificante (B) en la región 5' del gen de CD-E. Co, DNA control metilado *in vitro*. En la figura se marcan los sitios protegidos (triángulos blancos) o hipersensibles (triángulos negros), por comparación con el carril control, en las líneas MCA3D y CarB. Las regiones potenciales de regulación también se indican en la figura, así como el sitio de inicio de la transcripción (+1).

Promotor de CD-E

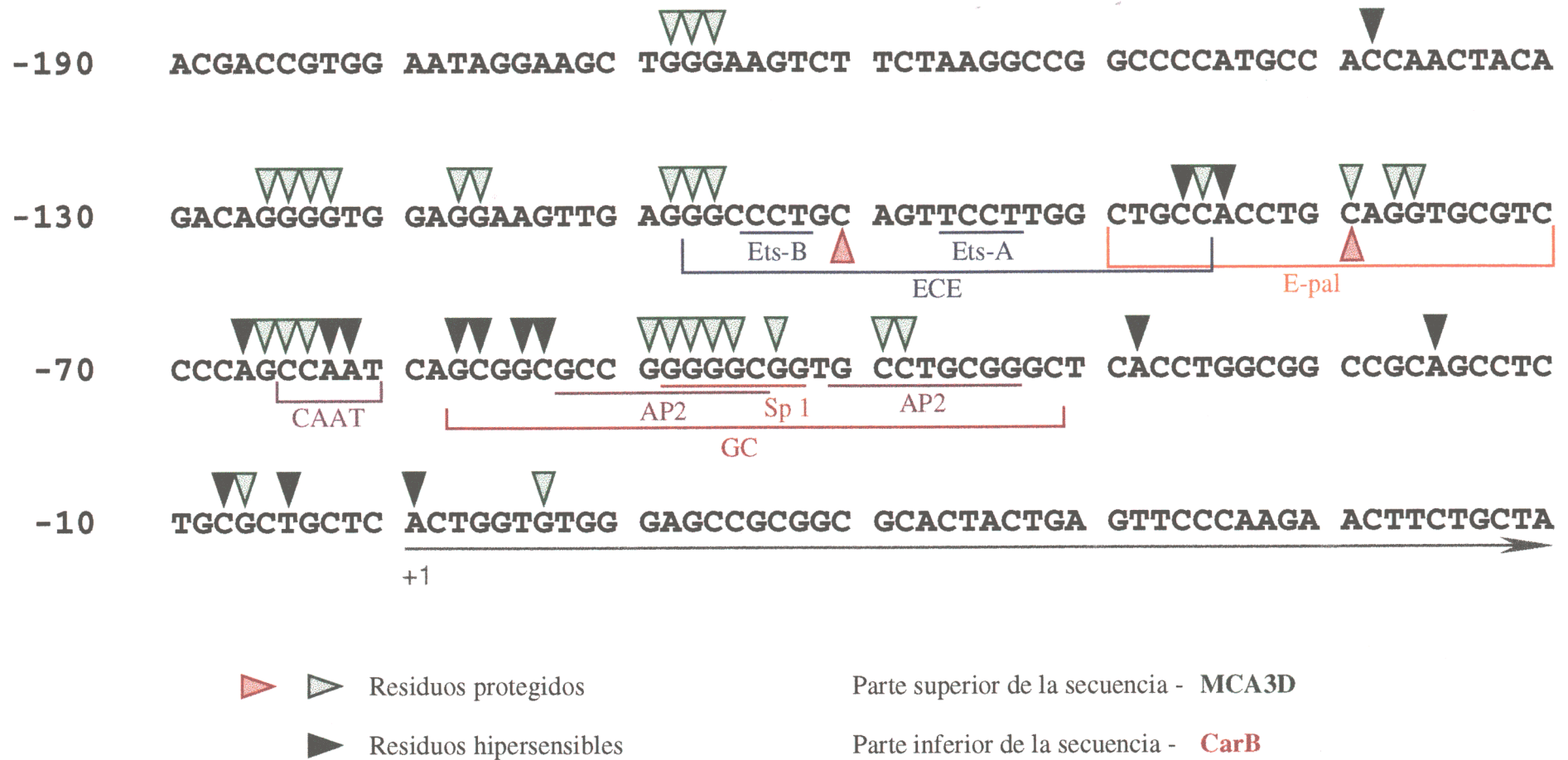


Fig. 35. Representación de los resultados obtenidos en los experimentos de footprinting *in vivo* del promotor de CD-E en las líneas MCA3D y CarB. En el esquema se muestran los sitios protegidos (triángulos punteados) o hipersensibles (triángulos opacos) obtenidos en los experimentos de footprinting *in vivo* con las dos cadenas de DNA en el promotor de CD-E (Fig. 34). Los sitios observados en la línea celular MCA3D se indican en verde, en la parte superior de la secuencia y los observados en la línea celular CarB en rojo, en la parte inferior. También se indican los potenciales sitios de regulación, el sitio de inicio de la transcripción (+1) y las secuencias que originarán el mRNA (subrayado con flecha).

mostrados). La línea celular E24 (CD-E positiva) también originó un patrón similar (Fig. 34B y resultados no mostrados para la cadena codificante), sobre todo en torno a la región E-pal y CCAAT. En la región rica en GC se observaron protecciones, pero de menor intensidad, y en menos sitios que en la línea celular MCA3D. Los sitios de hipersensibilidad en las posiciones -29, -16 y en el sitio de inicio de la transcripción también aparecieron. Asimismo, la posición -101 de la zona ECE, que se protegía en CarB, también se protegió en E24 (ver Fig. 34B).

Por otro lado, la línea celular HaCa4 (CD-E negativa) mostró un patrón mucho más parecido al de CarB, con protección en el centro del E-pal y en la posición -101, destacando la ausencia de protección en la caja CCAAT y sobre todo en la región rica en GC (Fig. 34B y resultados no mostrados)

En conjunto, estos resultados muestran una estructuración del promotor endógeno de CD-E diferente en líneas que expresan y no expresan CD-E, siendo en las primeras mucho más abierta, acorde con un estado transcripcional activo. Asimismo, en las líneas que expresan CD-E hay numerosas posiciones protegidas *in vivo*, probablemente por la interacción de factores de transcripción. Por otro lado, tanto el centro de la región E-pal como el borde del sitio Ets de la región ECE parecen estar interaccionando con factores nucleares en líneas celulares que no expresan CD-E.

2.5. Estudio comparativo de los promotores de CD-E Y CD-P de ratón.

Tal como se ha mencionado en la Introducción, la molécula de adhesión celular CD-P coexiste con la CD-E en las células de la capa basal de la epidermis, mientras que en las capas suprabasales desaparece la expresión de CD-P, manteniéndose la de CD-E. Por otro lado, mientras que la CD-E suele desaparecer en los primeros estadios de la progresión tumoral, la CD-P se mantiene, para desaparecer en los últimos estadios de la progresión, carcinomas fusiformes. Estos hechos hacen suponer una regulación compleja de la expresión de ambas moléculas, y la posibilidad de la existencia de mecanismos reguladores comunes para las dos moléculas de adhesión.

Estudios previos de nuestro grupo sobre el promotor de CD-P de ratón (Faraldo y Cano, 1993) indicaron que este promotor, al igual que el de CD-E, carecía de caja TATA y en su lugar había una secuencia consenso iniciadora, en el sitio de inicio de la transcripción (ver Fig. 36). Asimismo, se detectó la presencia de sitios potenciales de regulación, algunos de ellos comunes con los existentes en el promotor de CD-E. Así, en el promotor de CD-P existe una región rica en GC, en posición -101/-80, con un sitio consenso para SP1 (-85) y otro para AP2 (-95), y una caja CCAAT, situada en la misma posición (-65) que la del promotor de CD-E. No se detectó ninguna secuencia palindrómica semejante a E-pal en el promotor de CD-P.

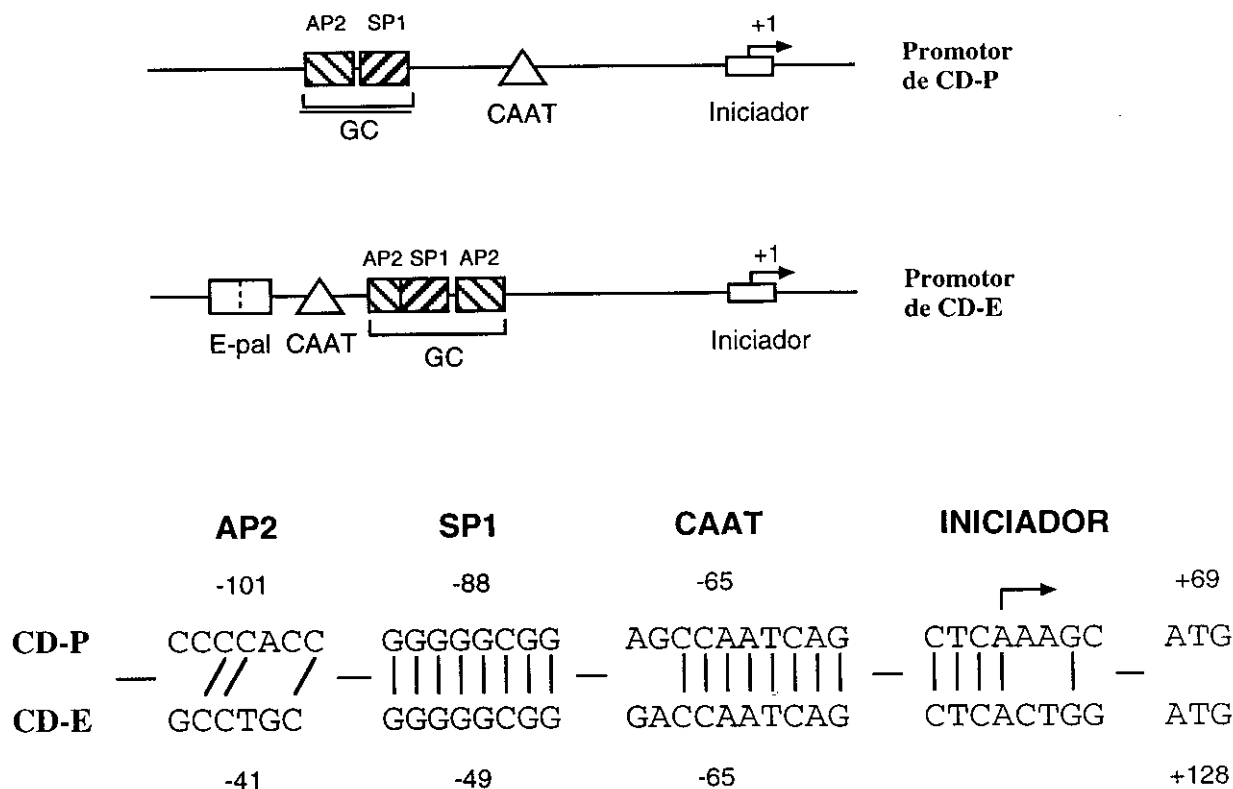


Fig. 36. Esquema comparativo de los promotores de CD-E y CD-P.

Parte superior: representación esquemática de las regiones 5' de los genes de CD-P y CD-E. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (+1) y posibles elementos reguladores en ambos promotores: regiones ricas en GC con sitios AP2 y SP1, cajas CCAAT, elemento E-pal y secuencia iniciadora.

Parte inferior: Comparación de las secuencias de varios elementos comunes de regulación entre el promotor de CD-P y el de CD-E, con indicación de su posición respecto al sitio de inicio de la transcripción en cada gen.

Se empleó también el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón para estudiar la regulación de la expresión de la CD-P, puesto que esta molécula desaparecía en las líneas celulares representantes del último estadio de la progresión maligna, CarB y MSC11A5, siendo positiva en el resto de líneas celulares de queratinocitos estudiadas (ver Fig. 8B y Tabla VI). Estudios recientes de la actividad promotora de CD-P en estas líneas habían mostrado que la actividad específica de tipo celular recaía en la región -200 a +47, y que tanto la región rica en GC como la caja CCAAT ejercían un efecto positivo en la actividad transcripcional. Asimismo, ensayos de footprinting *in vitro* mostraron que factores nucleares de líneas que expresan y que no expresan CD-P se unían a la región rica en GC y a la caja CCAAT (Faraldo *et al.*, 1997).

Por tanto, nos propusimos estudiar si algunos de los mecanismos de regulación de la expresión de ambas moléculas de adhesión podían ser comunes, en concreto a través de la caja CCAAT o de la región rica en GC.

Se realizaron ensayos de retardo en gel en paralelo empleando como sondas oligonucleótidos que incluían la caja CCAAT de los promotores de CD-P (CCAAT-P) o de CD-E (CCAAT-E). Como se puede observar en la Fig 37, que muestra el patrón obtenido con extractos nucleares de la línea PDV (CD-E y CD-P positiva), la sonda CCAAT-P originó un complejo de retardo mayoritario con movilidad electroforética similar a la del complejo 1 originado con la región homóloga de CD-E, aunque de mayor intensidad. Un exceso del oligonucleótido CCAAT-E era capaz de competir parcialmente el complejo 1 originado con la sonda CCAAT-P, mientras que un exceso del oligonucleótido CCAAT-P competía exclusivamente el complejo 1 originado con la sonda CCAAT-E, pero no afectaba a los otros dos complejos, tal como se ha comentado previamente (ver Fig. 24). Experimentos de competición con oligonucleótidos con sitios consenso para factores de unión a CCAAT mostraron que sólo el oligonucleótido de unión a CP1 era capaz de desplazar parcialmente la unión del complejo originado con la región CCAAT de CD-P (Fig. 37). Idénticos resultados se obtuvieron con extractos nucleares de CarB (CD-E y CD-P negativa) (datos no mostrados).

Estos resultados de competición cruzada indican que factores comunes, probablemente relacionados con CP1, participan en el reconocimiento de la región CCAAT de ambos promotores, mientras que factores adicionales, probablemente del tipo CP2 o C/EBP, participan específicamente en la interacción con la caja CCAAT del promotor de CD-E.

De igual modo se realizaron ensayos de retardo en gel y competiciones cruzadas utilizando como sondas oligonucleótidos conteniendo las regiones ricas en GC de los promotores de CD-P (GC-P) y de CD-E (GC-E). La figura 38 muestra el patrón que se obtuvo con extractos de la línea celular HaCa4 (CD-P positiva y CD-E negativa). El oligonucleótido GC-P originó dos bandas de retardo (1 y 2) con igual movilidad electroforética que las bandas 1 y 2 originadas con la región rica en GC de CD-E. El

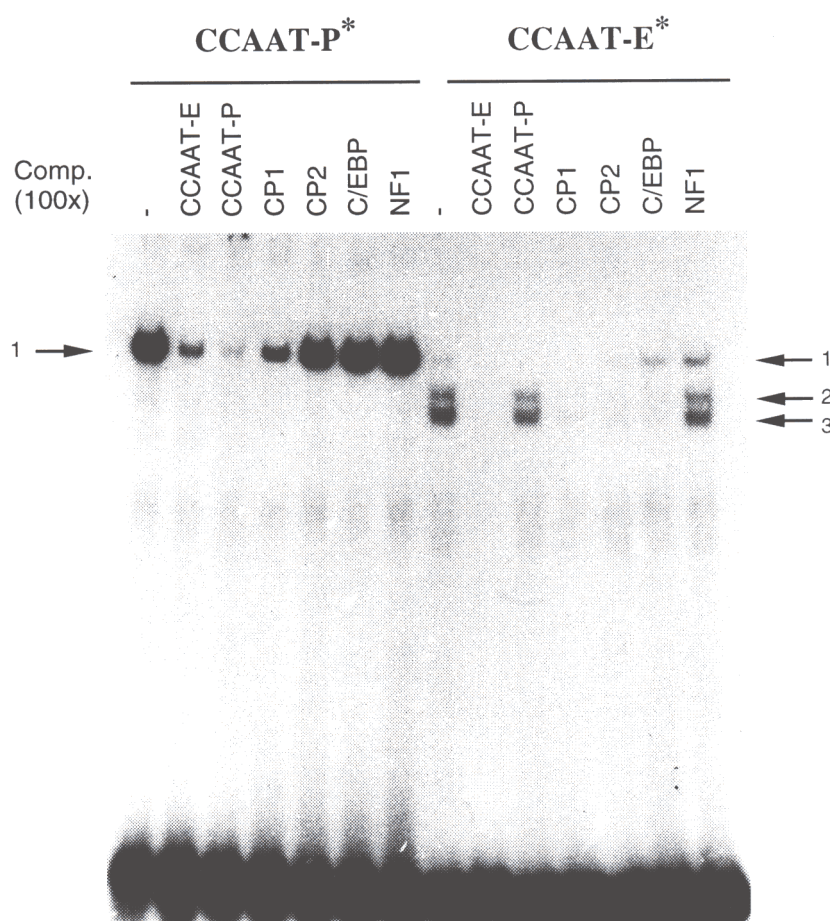


Fig. 37. Análisis comparativo de la unión de factores a la región CCAAT de los promotores de CD-P y CD-E. Experimentos de retardo en gel con 4 μ g de extracto nuclear de la línea PDV empleando una sonda que contenía la región CCAAT del promotor de CD-P (CCAAT-P *, parte izquierda) o del promotor de CD-E (CCAAT-E *, parte derecha). Se realizaron ensayos de competición en ausencia (-) o presencia de un exceso 100x de los oligonucleótidos indicados (los mismos que en la Fig. 24). Los complejos de retardo formados se indican con flechas (1, 2 y 3 con la sonda de CD-E y 1 con la sonda de CD-P).

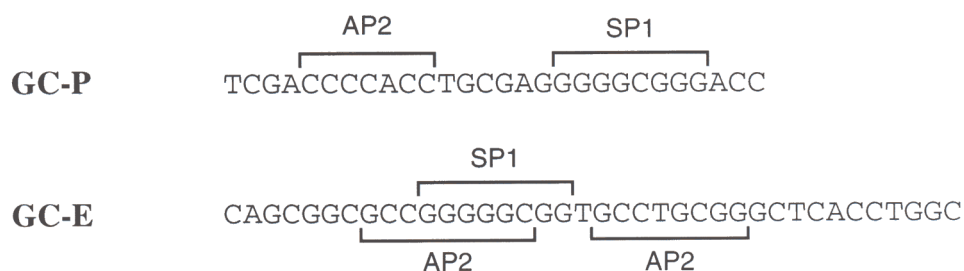
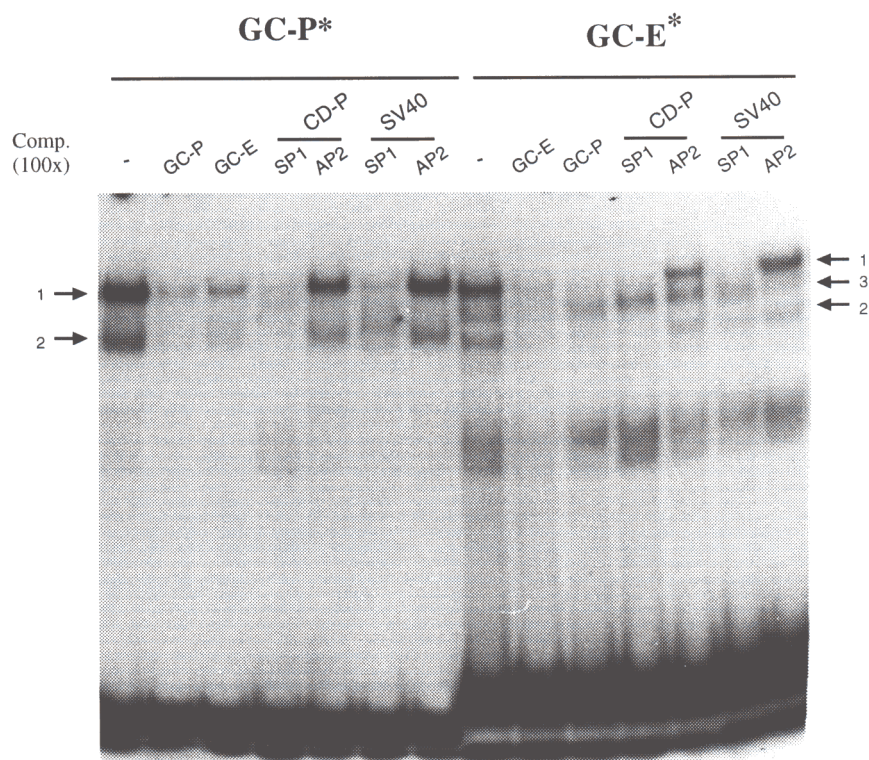
A**B**

Fig. 38. Comparación de la unión de factores nucleares a la región rica en GC de los promotores de CD-P y de CD-E.

A. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de retardo en gel conteniendo la región rica en GC del promotor de CD-P (GC-P) o del promotor de CD-E (GC-E). Los sitios consenso de unión a los factores SP1 y AP2 también se indican.

B. Ensayos de retardo en gel y de competición con 2.5 µg de extracto nuclear de HaCa4 y las sondas GC-P* (parte izquierda) o GC-E* (parte derecha). Se empleó un exceso 100x de los oligonucleótidos indicados. (-), ausencia de competidor. Los complejos formados con ambas sondas se indican con flechas (1, 2 y 3) a los lados de la figura.

oligonucleótido GC-E desplazó la unión de los dos complejos formados con la sonda de CD-P, mientras que el oligonucleótido GC-P sólo desplazó la unión de los complejos 1 y 2 originados con la sonda de CD-E, pero no del complejo 3 (Fig. 38B), tal como se mostró en la Fig. 25.

Los complejos 1 y 2, originados con la sonda de CD-P y la sonda de CD-E se competían con un fragmento de GC-P que contenía sólo el sitio SP1 (SP1-P) y con un oligonucleótido con el sitio consenso de unión a SP1 del promotor de SV40 (SP1-SV40). En cambio, oligonucleótidos que contenían el elemento AP2 de GC-P (AP2-P) o del promotor de SV40 (AP2-SV40) no eran capaces de desplazar la unión de ninguno de los dos complejos generados. El patrón de competición generado con extractos nucleares de PDV (CD-P positiva) y CarB (CD-P negativa) con la sonda GC-P fué prácticamente idéntico al generado con extractos de HaCa4 (resultados no mostrados).

Para determinar la naturaleza de los factores nucleares que interaccionan con la región rica en GC del promotor de CD-P, se realizaron experimentos de super-retardo con anticuerpos específicos. En la figura 39 aparecen los complejos y bandas de super-retardo obtenidas con la sonda GC-P, en comparación con los obtenidos con la sonda GC-E, previamente mostrados (Fig. 26). Como se puede observar, cuando se empleó un anticuerpo anti-AP2, el patrón de bandas originado con la sonda de la región GC del promotor de CD-P era el mismo que cuando se utilizaba una IgG control. En cambio, el empleo de un anticuerpo anti-SP1 inducía la generación de una banda de super-retardo, a la vez que la disminución de la intensidad de la banda 1, y en algunas ocasiones (CarB) también de la banda 2.

Todos estos datos, junto con el hecho de que el factor SP1 puro es capaz de interaccionar *in vitro* con las regiones GC-E y GC-P, mientras que el factor AP2 puro es capaz de interaccionar con la región GC-E pero no con GC-P en ensayos de retardo en gel (resultados no mostrados) y de footprinting *in vitro* (Fig. 27 y Faraldo *et al.*, 1997), sugieren que factores comunes del tipo SP1 reconocen las secuencias ricas en GC de ambos promotores de CD-E y CD-P, y que factores adicionales, del tipo AP2, estarían implicados de forma específica en el reconocimiento de la región rica en GC de CD-E.

Estas analogías y diferencias en las regiones reguladoras CCAAT y GC de ambos genes y en los factores que interaccionan con ellas nos plantearon la cuestión de si las regiones eran intercambiables. Por tanto, diseñamos construcciones de promotores híbridos, en los cuales las regiones reguladoras del promotor de CD-E se insertaron en posición 5' de secuencias reguladoras del gen de CD-P (Fig. 40).

La construcción -200P, que mostraba actividad específica de tipo celular, contiene secuencias 5' del gen de CD-P acopladas al gen chivato luciferasa, incluyendo la región rica en GC. La construcción -75P, que carece de la región rica en GC, mostró una actividad transcripcional sensiblemente menor (de un 12% a un 34% de la actividad de -200P) (Faraldo *et al.*, 1997 y Fig. 40A).

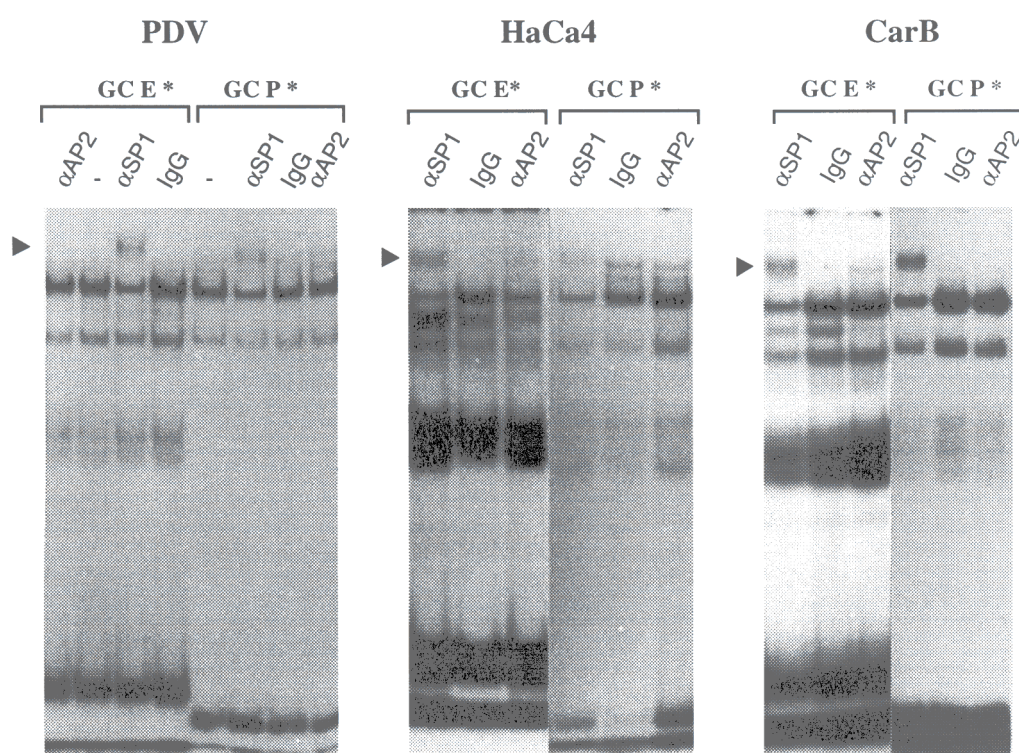
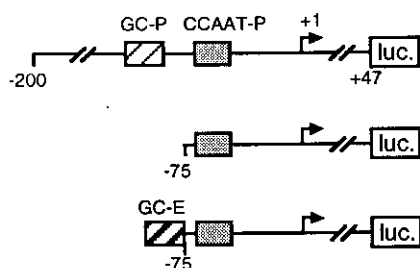
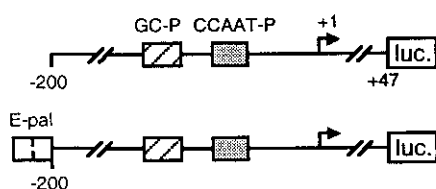


Fig. 39. La región rica en GC de CD-P reconoce factores tipo SP1. Experimentos de super-retardo empleando las sonda GC-E* (parte izquierda de cada panel) o GC-P* (parte derecha de cada panel) y 2.5 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas en ausencia (-) o presencia de 1.5 μ g de anticuerpo anti-SP1 (α SP1) o anti-AP2(α AP2) o de IgG de conejo (IgG) como control. Las bandas de super-retardo originadas por la presencia de anticuerpo se indican con una punta de flecha. Observar que en el caso de la sonda de CD-P solamente el anticuerpo anti-SP1 origina una banda de super-retardo.

A

	Actividad promotora			
	MCA3D	PDV	HaCa4	CarB
-200P	1.75	5.90	1.90	0.63
-75P	0.35	2.00	0.22	0.13
GC-E/-75P	0.83	3.70	0.80	0.50
Inducción*	x2.37	x1.85	x3.63	x3.85

B

	Actividad promotora			
	MCA3D	PDV	HaCa4	CarB
-200P	2.63	8.30	3.55	0.86
E-pal/-200P	2.43	6.04	2.17	0.85
Inhibición [#]	x0.92	x0.73	x0.61	x0.99

Fig. 40. Efecto de la región rica en GC y del elemento E-pal del promotor de CD-E en la actividad transcripcional del promotor de CD-P. En la parte izquierda de la figura se muestran las construcciones empleadas en los ensayos de actividad. En las construcciones híbridas GC-E/-75P (panel A) y E-pal/-200P (panel B), la región rica en GC proximal (-60/-23) y el elemento E-pal de CD-E(-92/-69), respectivamente, se insertaron en posición 5' de secuencias del promotor de CD-P. La actividad luciferasa en cada experimento se normalizó respecto a la actividad RSV- β gal y se expresó como porcentaje de la actividad del promotor de CMV en cada línea celular.

A. Efecto de la región rica en GC de CD-E en la actividad basal del promotor de CD-P en las líneas celulares indicadas. Se indica en la parte inferior la relación de actividades entre la construcción mixta GC-E/-75P y la construcción -75P (*).

B. Efecto del elemento E-pal en la actividad del promotor de CD-P en las diferentes líneas celulares. En la parte inferior se indica la relación de actividades entre la construcción mixta E-pal/-200P y la construcción -200P (#).

Para analizar si las regiones ricas en GC de CD-E y CD-P eran intercambiables, se diseñó la construcción GC-E/-75P, en la que se insertó la región rica en GC proximal de CD-E (-60/-23) en posición 5' de la construcción -75P del promotor de CD-P. Como se aprecia en la Fig. 40A la región rica en GC de CD-E indujo un aumento del orden de 2 a 4 veces en la actividad de la construcción -75P en las distintas líneas celulares de queratinocitos, originando valores de actividad del promotor de CD-P próximos a los de la construcción -200P (de un 50% a un 80%). Estos resultados indican que la región rica en GC de CD-E es capaz de sustituir parcialmente a la región homóloga del promotor de CD-P.

Asimismo, para analizar la posible influencia del elemento E-pal sobre la actividad de un promotor heterólogo como el de la CD-P, se diseñó la construcción E-pal/-200P (Fig. 40B), en la que se había insertado el elemento E-pal en posición 5' del promotor de CD-P en la construcción -200P. La figura 40B muestra que el elemento E-pal indujo un moderado efecto inhibitor en la línea HaCa4, mientras que en las otras líneas examinadas el efecto era mucho menor o prácticamente nulo.

Todos estos datos sugieren que en la regulación de la expresión de ambas moléculas existen mecanismos comunes, pero también mecanismos diferenciales, y que la regulación de la transcripción del gen de CD-E de ratón probablemente sea más compleja e incluya mecanismos adicionales a los de la transcripción del gen de CD-P de ratón.

DISCUSIÓN

1. IMPLICACIÓN DE LA CD-E EN LA METÁSTASIS. RELACIÓN CON LA MMP-9.

1.1. CD-E y propiedades tumorales: Papel en la metástasis.

Es un hecho demostrado que la molécula de adhesión celular CD-E está implicada en el proceso tumoral en el sentido en que previene un comportamiento invasivo de las células tumorales, y que su ausencia induce un aumento en la invasividad celular (Behrens *et al.*, 1989; Frixen *et al.*, 1991; Vleminckx *et al.*, 1991). Este hecho está corroborado por diversos estudios sobre la expresión de CD-E en muestras clínicas de carcinomas de distinto origen y en líneas celulares derivadas de tumores donde la ausencia de CD-E se correlaciona con un menor grado de diferenciación y una mayor capacidad invasiva (Frixen *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1992; Gamallo *et al.*, 1993; Takeichi, 1993; Umbas *et al.*, 1994; Oka *et al.*, 1996). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con la mayoría de estudios sobre el tema: la falta de CD-E (inducida mediante el bloqueo de su expresión por transfección con un cDNA antisentido de CD-E) induce en la línea celular E24 una mayor capacidad invasiva *in vitro* (Fig. 13).

La relación de la CD-E con el comportamiento metastásico, en cambio, no está tan bien establecida. Algunos estudios sobre expresión de CD-E en líneas celulares tumorales indican que la presencia o ausencia de CD-E es independiente de la capacidad metastásica (Bussemakers *et al.*, 1992; Caulín *et al.*, 1996). Por otro lado, numerosos estudios clínicos indican que aquellos tumores con capacidad de metastatizar muestran menor expresión de CD-E (Schipper *et al.*, 1991; Umbas *et al.*, 1992; Mayer *et al.*, 1993; Oka *et al.*, 1993; Katagiri *et al.*, 1995;), mientras que también existen estudios clínicos en los que no se observa dicha correlación (Oka *et al.*, 1992; Gamallo *et al.*, 1996; Zschiesche *et al.*, 1997). Sin embargo, en nuestro conocimiento, tan solo existía un trabajo en el que se relacionaba de forma directa la ausencia de CD-E con el comportamiento metastásico en líneas de cáncer de mama (Mbalaviele *et al.*, 1996). En este trabajo se muestra cómo la transfección de CD-E en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, que provoca metástasis en hueso, disminuye de forma considerable su agresividad y su capacidad metastásica.

Nuestros resultados muestran claramente que la pérdida de CD-E en la línea celular E24, tumorigénica pero no metastásica, es capaz de provocar en la misma un comportamiento metastásico (Tabla IV). En este sentido, es uno de los primeros trabajos, junto con el del grupo de Mbalavile, en donde se muestra una correlación directa y causal entre la presencia o ausencia de CD-E y la capacidad metastásica.

Debido a la naturaleza multicausal del cáncer y de la metástasis, esta correlación no tiene porqué suceder siempre, ni en todos los tipos de carcinomas. El hecho tumoral y metastásico depende de numerosos factores y de la combinación de los mismos, por lo que uno sólo aisladamente (como puede ser la presencia o ausencia de CD-E) no es suficiente para poder predecir el comportamiento metastásico de un determinado tipo de tumor o línea

celular. En cualquier caso, la presencia o ausencia de CD-E, sí puede ser capaz, en algunas circunstancias, de desviar la balanza en un sentido o en otro.

Así, ni siquiera en el sistema de la carcinogénesis de piel de ratón la presencia de CD-E es siempre suficiente para evitar un comportamiento metastásico. De hecho, la línea celular E62 expresa CD-E y es, en cambio, metastásica (Caulín *et al.*, 1996). El comportamiento metastásico de esta línea celular podría explicarse por los niveles elevados de v-Ha-ras que presenta, a diferencia de E24 donde los niveles de v-Ha-ras son mucho menores (Caulín *et al.*, 1996). De hecho, se ha demostrado que células transformadas con ras se vuelven tumorogénicas y en algunos casos metastásicas (Mareel *et al.*, 1991) y que los niveles de Ha-ras corresponden muchas veces con el comportamiento maligno (Brissette *et al.*, 1993; Chambers y Tuck, 1993).

Otra posible explicación para el hecho de que E62 sea metastásica es la posibilidad de que exista una "downregulación" transitoria de la función o expresión de CD-E durante el proceso metastásico, que permita a las células liberarse del tumor primario y poder migrar por el torrente circulatorio. De hecho, el fenómeno de la inestabilidad de la expresión de CD-E *in vivo* se ha evidenciado ya en otros sistemas. Así, Mareel *et al.* (1991) obtuvieron evidencias de que factores del huésped *in vivo* pueden inducir pérdida de CD-E: la línea celular MDCK-ras-e (MDCK transformada con ras) que en cultivo expresaba CD-E de forma homogénea y no era invasiva, cuando se inyectaba en ratones, se volvía invasiva y metastásica, y tanto los tumores primarios como las metástasis eran heterogéneos, con zonas donde se expresaba CD-E y zonas CD-E negativas. Cuando se cultivaban *in vitro* explantes de estos tumores, después de varios pases las células expresaban CD-E homogéneamente. Estos experimentos sugieren que en el huésped existen factores que pueden "downregular" la expresión de CD-E. Esta heterogeneidad en la expresión en CD-E en relación con el comportamiento invasivo y metastásico no es un hecho aislado y ocurre asimismo en líneas de carcinoma de ovario en cultivo (Hashimoto *et al.*, 1989) y en carcinomas de diverso origen (Shimoyama y Hirohashi, 1991a y 1991b; Bussemakers *et al.*, 1992). Otro posible mecanismo es una disminución de la función de CD-E sin pérdida de expresión, por ejemplo por mecanismos moleculares como fosforilación o defosforilación de las cateninas, que pueden modular las interacciones celulares (Kemler, 1993), o también por modulaciones en los niveles de β -catenina o plakoglobina, que pueden afectar a las rutas de señalización mediada por ellas. Estos fenómenos podrían jugar un papel clave en la invasión y metástasis.

Si este es el caso, es lógico que al eliminar la CD-E, como ocurre en los transfectantes antisentido de CD-E, las células puedan metastatizar mucho más fácilmente, puesto que se favorecen las condiciones para escapar del tumor primario. Si a este hecho se une además que con la pérdida de CD-E las células adquieren una mayor capacidad degradativa de la matriz extracelular (como se discutirá más adelante), las posibilidades de metastatizar son aún mayores.

Para nosotros era importante, a la hora de otorgar a la ausencia de CD-E el papel causal en la metástasis, analizar los niveles de v-Ha-ras, puesto que es posible que hubiera una heterogeneidad poblacional en las células E24, y que por el proceso de la transfección y selección con puromicina se hubieran seleccionado aquellas células con altas dosis de v-Ha-ras. En este caso, no podríamos diferenciar entre los efectos producidos por altas dosis de v-Ha-ras y los producidos por la ausencia de CD-E. Los análisis de Northern-blot (Tabla V) demostraron que los niveles de v-Ha-ras no se habían alterado tras la transfección, y los transfectantes mantenían niveles bajos de v-Ha-ras, similares a los mostrados por la línea parental E24.

Por otro lado, tampoco creemos que los efectos observados puedan deberse a un efecto inespecífico de bloqueo de la expresión de cualquier otro gen por el cDNA antisentido, ya que la molécula de mayor homología presente en estas líneas de queratinocitos, la CD-P, no veía alterada su expresión (Fig. 11 y Fig. 12B).

1.2. Mecanismos implicados en la mayor capacidad metastásica e invasiva por la pérdida de CD-E: Papel de MMP9.

Puesto que los transfectantes antisentido eran más invasivos y metastásicos, nos preguntamos si la simple pérdida de adhesión intercelular era suficiente para provocar el comportamiento más agresivo de las células o si, por el contrario, la pérdida de CD-E provocaba en las mismas algún cambio adicional que contribuyera a la malignidad. Como se indicó en la Introducción, en el fenómeno metastásico juegan un papel esencial los procesos de degradación de la matriz extracelular, en los que intervienen principalmente proteasas del grupo de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y el activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA). Por ello, decidimos investigar la actividad de estas proteasas en nuestro sistema celular.

Un estudio previo de Frixen y Nagamine (1993) había puesto de manifiesto que el tratamiento de células de carcinoma de mama con DECMA (un anticuerpo bloqueante de la función de CD-E) inducía un aumento en los niveles de uPA secretado al medio extracelular, que era el responsable de la mayor capacidad invasiva que presentaban las células tras el tratamiento con DECMA. En este sentido nos pareció lógico pensar que un mecanismo similar funcionara también en las células E24 transfectadas con el vector antisentido de CD-E, y que un bloqueo de la función de CD-E indujera aumento en la secreción de uPA. Sin embargo, la medida de actividad uPA en el medio condicionado y en el extracto celular indicó que el uPA no parecía ser el responsable del aumento de invasividad en los transfectantes antisentido de CD-E (Fig. 14). Las diferencias entre ambos estudios pueden deberse a los diferentes sistemas experimentales: distintas proteasas pueden ser responsables de la invasividad en tumores de distinto origen.

Por el contrario, el estudio de la actividad gelatinolítica de las líneas celulares de queratinocitos sí reveló una interesante relación entre la presencia de CD-E y la actividad

gelatinolítica MMP-9: aquellas líneas que expresaban CD-E apenas mostraban actividad MMP-9 y las que no expresaban CD-E poseían una alta capacidad degradativa por MMP-9 (Fig. 15A y Fig. 16A). Por los sistemas experimentales empleados: transfección de CD-E en una línea que no la expresa (HaCa4) y transfección de un cDNA antisentido de CD-E en una línea que sí la expresa (E24) y análisis de los clones generados, ésto no parece una simple correlación, sino una relación causal. Queda por determinar con exactitud si la regulación ejercida por CD-E sobre la expresión de MMP-9 es a nivel transcripcional o post-transcripcional, ya que, mientras en los clones originados por la transfección de HaCa4 la expresión de CD-E induce una disminución notable en los niveles de mRNA de MMP-9 (Fig. 16B), el bloqueo de la expresión de CD-E en E24 (clones antisentido) sólo es capaz en algunos casos (clon P1-5) de inducir un incremento considerable en los niveles de mensajero de MMP-9 (Fig. 15B). Deben existir, por tanto, mecanismos postranscripcionales (por ej., estabilidad del mensajero o de la proteína, control de traducción o control de secreción) responsables del aumento de actividad MMP-9 en los clones P1-10 y P1-13. Esto sugiere que el control que ejerce CD-E sobre MMP-9 se realiza a varios niveles, aunque el mecanismo exacto lo desconocemos actualmente, y debe ser objeto de posteriores estudios. En cualquier caso, parece que el aumento de la actividad MMP-9 en los transfectantes antisentido se debe a un efecto específico originado por la pérdida de adhesión mediada por CD-E, y no a la simple pérdida de contactos celulares, ya que estas células siguen manteniendo contactos entre sí, por la presencia de CD-P.

Nuestros resultados comparten cierta analogía con los obtenidos por el grupo de Takeichi (Miyaki *et al.*, 1995), que transfectó el cDNA de CD-E en una línea celular de carcinoma de colon altamente invasiva. Algunas de las líneas generadas, además de presentar menor capacidad invasiva mostraron un descenso significativo en la secreción de una gelatinasa de 62 KDa, correspondiente con la MMP-2. Estos estudios, junto con los resultados mostrados en esta Tesis, están de acuerdo con una regulación de MMPs por parte de la CD-E. La diferencia en el tipo de MMP está de acuerdo con la idea de que diferentes proteasas juegan un papel prioritario en diferentes tipos tumorales. De hecho, la línea parental empleada en el trabajo de Miyaki no mostraba actividad gelatinolítica detectable MMP-9. En nuestras líneas celulares de queratinocitos de ratón, el examen de otras MMPs mostró que la principal gelatinasa expresada era MMP-9, mientras que los niveles de MMP-2, MMP-3 y MMP-7 eran prácticamente indetectables, por lo que no creemos que jueguen un papel esencial en este sistema de carcinogénesis química de piel de ratón.

Por otro lado, ya se había sugerido, en otros sistemas experimentales, que la presencia de CD-E podía alterar la expresión de algunos genes, como es el caso de la inducción de la expresión de proteínas desmosomales en una línea celular de epitelio de retina tras la transfección con CD-E (Marrs *et al.*, 1995). Recientemente Larue *et al.* (1996) emplearon un sistema experimental, basado en la manipulación de células embrionarias stem (ES), para demostrar que distintos tipos de cadherinas podían dirigir la formación de

distintas estructuras tisulares (epitelio por CD-E). Además observaron que la CD-E inducía represión en la expresión del factor de transcripción mesenquimal T-brachiury, sugiriendo que la presencia o ausencia de CD-E influye en una actividad génica específica.

Teniendo en cuenta estos datos, junto con los obtenidos en esta Tesis, es tentador especular sobre un posible mecanismo por el que la CD-E participaría en la transmisión de una señal que en último término tendría una consecuencia transcripcional, para poner en marcha un determinado programa. Las recientes evidencias sobre la participación de la β -catenina en señalización celular (Gumbiner *et al.*, 1995) permiten hipotetizar que la CD-E actúa controlando los niveles de β -catenina o plakoglobina libre que es encargada de transmitir la señal al núcleo. En este sentido, sería de gran utilidad examinar en los transfectantes antisentido de CD-E la distribución de β -catenina y plakoglobina: nuclear, citosólica o anclada a complejos de CD-P en contactos celulares.

2. MECANISMOS QUE CONTROLAN LA EXPRESIÓN DE CD-E EN LA CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATÓN.

El hecho de que en muchos carcinomas indiferenciados se pierda la expresión de CD-E, y el posible papel causal que ésta tiene en la malignidad, hace que sea de gran interés el estudio de los mecanismos que controlan la expresión de esta molécula. Además, el conocimiento de tales mecanismos puede servir para comprender mejor las bases de la expresión específica de tejido epitelial, ya que la CD-E se expresa exclusivamente en tejidos epiteliales en el organismo adulto.

Estudios previos sobre el promotor de CD-E, empleando principalmente líneas de carcinoma de mama y de glándula mamaria normal (Behrens *et al.*, 1991) habían mostrado que un fragmento del gen de CD-E de ratón que comprendía las posiciones -178/+92, respecto del sitio de inicio de la transcripción, mostraba actividad transcripcional específica. La especificidad epitelial vendría dada por el elemento palindrómico E-pal, que se proponía que estimulaba la transcripción en líneas epiteliales y la inhibía en líneas que no expresan CD-E. Sin embargo, no se observaron diferencias en los factores nucleares expresados por líneas CD-E positivas y negativas por experimentos de unión a DNA *in vitro* (footprinting *in vitro* y retardo en gel) (Behrens *et al.*, 1991). Resultados similares se observaron con una región homóloga del gen de CD-E humana (Bussemakers *et al.*, 1994a).

Nosotros pensamos que el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón podía ser un sistema útil para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de control de la expresión de CD-E, ya que proporciona una serie de líneas celulares que representan distintos estadios de la progresión tumoral y donde la expresión de cadherinas se asemeja a lo que sucede *in vivo* durante la carcinogénesis de piel. Además, en concreto, el conocimiento de los eventos transcripcionales que llevan a la línea celular E24 a reexpresar CD-E podía ser de gran utilidad para comprender los mecanismos que inducen las

características peculiares de menor agresividad que muestra esta línea celular respecto a la línea parental HaCa4.

Hay dos mecanismos principales que, a grandes rasgos, pueden hacer que un gen se transcriba o se mantenga reprimido, que no tienen porqué ser excluyentes entre sí, y que, de hecho, puede afectarse mutuamente: a) la presencia de una serie de factores trans (factores de transcripción o cofactores) que pueden influir estimulando o reprimiendo la transcripción, generalmente por interacción con la maquinaria basal de transcripción; y, b) la estructura misma del DNA y la cromatina en la región que rodea al gen (factores que actúan en cis). En este último caso, mecanismos como el empaquetamiento de la cromatina en nucleosomas o la metilación endógena del DNA en islas CpG pueden reprimir la actividad transcripcional de un gen (Cedar, 1988; Counts y Goodman, 1995).

En el estudio de la regulación transcripcional del gen de CD-E de ratón abordado en la presente memoria nos hemos centrado principalmente en los mecanismos que actúan en trans, y en concreto a través de la región comprendida entre las posiciones -178/+92 del promotor de CD-E, que había mostrado actividad específica en otros sistemas celulares (Behrens *et al.*, 1991).

2.1. Región -178/+92. Elementos reguladores.

Los estudios de transfección transitoria en los queratinocitos de ratón mostraron que la región -178/+92 del promotor de CD-E posee actividad transcripcional específica celular: es activa en líneas que expresan CD-E e inactiva en líneas de fenotipo fibroblastoide que no expresan CD-E (Fig. 18). La línea epiteloide HaCa4, CD-E negativa, mantiene un cierto nivel, aunque reducido, de actividad promotora. Este dato quizás puede tener relación con el hecho de que, bajo ciertas circunstancias, esta línea celular puede reactivar la expresión de CD-E, como ocurre esporádicamente en células aisladas en cultivo a confluencia o tras su inyección en ratones desnudos (Navarro *et al.*, 1991), indicando que la pérdida de CD-E no es un hecho irreversible en esta línea celular.

Asimismo, hemos encontrado en esta región elementos reguladores positivos: región rica en GC y caja CCAAT, así como secuencias reguladoras negativas, como el elemento E-pal, que actúa en todas las líneas de queratinocitos examinadas. Estas observaciones están de acuerdo con otros estudios sobre el promotor de CD-E en otros sistemas, si bien parece que el elemento E-pal en células de carcinoma de mama que expresan CD-E juega un moderado papel regulador positivo (Behrens *et al.*, 1991; Hennig *et al.*, 1996). Además, hemos encontrado otra región reguladora, que a través de un sitio de unión a factores de la familia Ets, actúa como modulador negativo de la transcripción en células de queratinocitos que expresan CD-E.

2.1.1. Elemento represor E-pal.

El efecto represor del elemento E-pal es mayor en las líneas que no expresan CD-E y es particularmente intenso en la línea fusiforme CarB (Fig. 19), representante del último estadio de la progresión tumoral. Por otra parte, este elemento se encuentra protegido en experimentos de footprinting *in vitro* con extractos celulares de todas las líneas analizadas, pero de forma diferente en líneas que expresan y que no expresan CD-E (Fig. 21). Los experimentos de retardo en gel, sin embargo, muestran que en todas las líneas existe un factor/es que forma un complejo similar que puede unirse a este elemento. Estas aparentes discrepancias pueden explicarse por la existencia de factores similares pero con distintas propiedades transcripcionales en líneas que expresan y no expresan CD-E, por modificaciones diferenciales en el factor o por la interacción con diferentes cofactores. En cualquier caso, los experimentos de footprinting *in vivo* (Fig. 34 y 35) indican que en las líneas que no expresan CD-E, una de las pocas posiciones protegidas es la posición central del elemento E-pal, lo que apoya la idea de un predominante papel represor del elemento E-pal en células CD-E negativas.

La existencia de dos cajas E en el elemento E-pal sugieren que el potencial elemento represor que se une a este elemento podría pertenecer al grupo de factores de transcripción bHLH, que se unen a cajas E (secuencia consenso CANNTG). De esta forma, diferencias en los tipos de factores, en los heterodímeros formados o en posibles cofactores o proteínas de interacción darían cuenta del efecto diferencial entre líneas positivas y negativas. Alternativamente, el posible factor de transcripción bHLH podría ser desplazado de su interacción con el elemento E-pal, en mayor o menor medida por un inhibidor, ejerciendo así el efecto represor. Los niveles y propiedades de este factor inhibidor serían los responsables en este caso del efecto diferencial. Otra posible opción es que el factor/es que se unen al elemento E-pal no esté relacionado con los factores de transcripción del tipo bHLH. Con los datos que disponemos actualmente no podemos discernir cual de las posibilidades es la correcta, aunque sí podemos hipotetizar sobre posibles mecanismos.

La hipótesis de un factor tipo bHLH cobra más fuerza si tenemos en cuenta los efectos que la proteína de adenovirus E1a produce en algunas líneas celulares. E1a es capaz de inducir una conversión hacia un fenotipo epiteloide en una variedad de líneas fibroblastoides de diverso origen, y en concreto, induce la expresión de CD-E en una línea celular de rhabdomyosarcoma que no la expresaba (Frisch, 1994). En nuestro laboratorio también hemos observado que E1a puede inducir la expresión de CD-E en la línea celular MSC11A5 (Sánchez-Prieto *et al.*, 1996 y resultados no mostrados). Por otra parte, se ha descrito que E1a es capaz de interaccionar con el dominio bHLH de algunos factores de este tipo, como miogenina y E12, reprimiendo así la expresión promovida por estos factores e inhibiendo la diferenciación miogénica (Taylor *et al.*, 1993). Por tanto, es tentador especular que el mecanismo por el que E1a induce la expresión de CD-E en algunos sistemas es

mediante la liberación del bloqueo en su expresión ejercido a través del elemento E-pal por factores del tipo bHLH.

Por otro lado, la caja E situada en la mitad 5' del elemento E-pal contiene la secuencia CACCT. Se ha descrito que el represor δ EF1 se une específicamente a estas secuencias contenidas en algunas cajas E, compitiendo con los factores activadores bHLH por la unión a la caja E y ejerciendo así un efecto represor (Sekido *et al.*, 1994). El represor δ EF1 se expresa durante el desarrollo embrionario principalmente en derivados mesodérmicos (miotomo) y tejido neural (notocorda) (Sekido *et al.*, 1994). La idea de un elemento represor que compite con los factores activadores bHLH podría explicar el efecto regulador positivo del elemento E-pal observado por el grupo de Birchmeier en líneas que expresan CD-E (Behrens *et al.*, 1991; Hennig *et al.*, 1996). Sin embargo, en nuestro sistema experimental se observa un incremento en la actividad tras la mutación del elemento E-pal, también en células CD-E positivas (Fig. 19). Estos datos sugieren más bien que el inhibidor tiene un efecto represor *per se* y no por desplazamiento de un activador que actúe a través del elemento E-pal.

La compartimentalización de los factores de la familia Myc/Max en las distintas capas de la epidermis (Hurlin *et al.*, 1995a; Hurlin *et al.*, 1995b; Gandarillas y Watt, 1995) junto con su papel en procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis (Amati y Land, 1994) nos hizo pensar que estos factores, de la familia bHLH, pudieran intervenir en la represión mediada por E-pal. Además, la posibilidad de formar heterodímeros con diferentes miembros, que activan o reprimen la transcripción podría ayudar a crear el efecto diferencial en células CD-E positivas y CD-E negativas. Sin embargo nuestros resultados preliminares mediante estudios de cotransfección con miembros de esta familia (Tabla VIII) no nos permiten confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, en el elemento E-pal también existen sitios consenso de unión de los factores tipo dedos de zinc Snail (Mauhin *et al.*, 1993) y Escargot (Fuse *et al.*, 1994) descritos por primera vez en *Drosophila*, pero con funciones también en organismos superiores. Los factores Snail y Slug son muy similares y tienen un patrón de expresión en desarrollo muy peculiar, en zonas de migración de la cresta neural y en zonas de invaginación del ectodermo para formar derivados mesodérmicos (Nieto *et al.*, 1994). Estos datos nos inclinaron a pensar que factores del tipo Snail/Slug podrían participar en la disminución de la expresión de la CD-E durante la progresión tumoral, que en cierto modo es una transición epitelio-mesénquima. Los resultados obtenidos mediante cotransfección de estos factores indicaron que quizás en la línea celular HaCa4 factores de este tipo pueden jugar un papel en el bloqueo de la expresión de CD-E, pero no en líneas de queratinocitos que expresan CD-E, como la línea celular MCA3D (Tabla VIII). De hecho, la transfección estable de Snail, y en mayor medida de Slug, induce en la línea celular HaCa4 un cambio hacia un fenotipo fibroblastoide, con pérdida de contactos y emisión de prolongaciones citoplásmicas (resultados no mostrados), aunque no hemos estudiado con más detalle los

cambios producidos. Estas observaciones estarían de acuerdo con resultados recientes en células de vejiga de rata, NBT-II, que muestran que Slug puede jugar un papel en las transiciones epitelio-mesénquima (Savagner *et al.*, 1997). Sin embargo, en las líneas MCA3D y PDV la transfección de Slug de forma estable provoca un incremento de los niveles de CD-E y de CD-P, detectados por RT-PCR (resultados no mostrados, en colaboración con A. Nieto, Instituto Cajal), hecho que está de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de transfección transitoria en la línea MCA3D (Tabla VII). En concordancia con el papel positivo que pueden tener factores de este tipo sobre la regulación de CD-E en algunos tipos celulares, por ejemplo MCA3D, recientemente se ha demostrado que el factor Escargot controla de forma positiva la expresión de CD-E en *Drosophila* (Tanaka-Matakatsu *et al.*, 1996). La secuencia de unión a Escargot (G/ACAGGTG) contiene una caja E y en células de *Drosophila* Escargot bloquea la activación transcripcional inducida por un heterodímero de proteínas bHLH (Fuse *et al.*, 1994), sugiriendo que Escargot puede regular procesos dependientes de proteínas bHLH.

Todos estos datos dan una idea de la compleja naturaleza de las interacciones entre factores de transcripción y sus inhibidores. La diferencia de comportamiento entre diferentes líneas celulares puede deberse a la diferente combinación de factores endógenos que estaría en relación con el estadio de diferenciación en que se encuentren, y podría promover la conversión hacia un fenotipo mesenquimal o epitelial en cada caso.

2.1.2. La región GC y la caja CCAAT regulan positivamente la transcripción.

Los ensayos de transfección transitoria del promotor de CD-E (Fig. 18 y Fig. 20) indicaron que tanto la región rica en GC como la caja CCAAT del promotor de CD-E actúan como reguladores positivos de la transcripción de CD-E en las líneas analizadas. Aunque todas líneas de queratinocitos poseían factores capaces de unirse a estas regiones, tal como indican los ensayos de retardo en gel con las sondas CCAAT-E y GC-E (Fig. 24 y Fig. 25), sin embargo deben existir diferencias en la naturaleza de los factores o cofactores que interaccionan con estas regiones entre líneas CD-E positivas y CD-E negativas, como lo evidencia el menor patrón de protección observado en los experimentos de footprinting *in vitro* con extractos de líneas CD-E negativas (Fig. 21). Además, *in vivo*, estas regiones se encuentran ocupadas por factores solamente en aquellas líneas que expresan CD-E, tal como lo evidencian los ensayos de footprinting *in vivo* (Fig. 34 y 35), lo que sugiere que estas regiones sólo ejercen su efecto estimulador en estas líneas.

Los resultados de super-retardo en gel (Fig. 26) muestran con claridad que los factores de transcripción SP1 y AP2 son capaces de unirse a la región rica en GC de CD-E, y por tanto es muy probable que jueguen un papel importante en la regulación de la transcripción de CD-E.

La aparente discrepancia en los resultados sobre unión de factores en los ensayos de retardo en gel y de footprinting *in vitro*, pueden explicarse por la existencia en unas líneas y otras de diferentes cofactores o factores de transcripción que modulen su interacción con el DNA, y posiblemente también su actividad funcional, y que sólo en el contexto de una región amplia de DNA pueda evidenciarse su efecto, originando un patrón de protección diferente.

En cualquier caso, los factores de unión no parecen ser idénticos, como lo evidencia el diferente patrón de competición de los complejos generados por la región GC con extractos nucleares de PDV (CD-E positiva) y de CarB y HaCa4 (CD-E negativas) (ver Fig. 25). En este sentido, se ha descrito la existencia de diferentes isoformas del factor AP2, reguladas durante el desarrollo (Meier *et al.*, 1995; Chazaud *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1997). De igual manera también se han encontrado diversas isoformas de SP1 durante el desarrollo embrionario de ratón (Saffer *et al.*, 1991), que sugieren que SP1 podría tener un papel en procesos de diferenciación, además de su papel general en la transcripción de genes "housekeeping".

Chen *et al.* (1997) proponen que la relación entre las concentraciones de SP1 y AP2 puede modular la transcripción de la citoqueratina K3, que se expresa en las capas diferenciadas del epitelio de la córnea. El promotor de la K3 contiene sitios solapantes SP1 y AP2, donde SP1 activa y AP2 reprime la transcripción. Cuando se inducen a diferenciar células basales epiteliales indiferenciadas de córnea de conejo la relación de actividades SP1/AP2 de unión a DNA aumenta, coincidiendo con la activación del gen de K3 y la represión del gen de K14, citoqueratinas de capas diferenciadas y basales del epitelio de córnea, respectivamente. Un mecanismo similar podría tener lugar en la epidermis. En este sentido, el análisis por inmunoblot de los niveles de SP1 en las distintas líneas de queratinocitos no reveló diferencias en las cantidades de SP1, apareciendo en todos los casos dos bandas, resultantes probablemente de diferente grado de fosforilación (Jackson *et al.*, 1990) (resultados no mostrados). Los intentos de detección del factor AP2 con el anticuerpo de que disponíamos fueron fallidos. La idea de que AP2 pueda modular negativamente la transcripción, compitiendo con SP1 por la unión al DNA, no es contradictoria con nuestros resultados. Así, las mutaciones de las construcciones mut GC1 y mut GC2 (que son menos activas que la construcción silvestre, Fig. 20) pueden afectar a la unión a SP1, y no exclusivamente a la unión a AP2. Por otro lado, y por el hecho de que los sitios de unión a SP1 y AP2 de la región rica en GC son prácticamente solapantes (ver Fig. 27), el efecto inhibitor de la cotransfección con el dominante negativo de AP2 (Tabla IX), podría deberse también al desplazamiento de factores SP1, y no sólo al desplazamiento de AP2. En apoyo de esta hipótesis está el hecho de que el factor AP2 transmite los efectos de promotores tumorales tipo ésteres de forbol (Imagawa *et al.*, 1987), y esto podría representar uno de los mecanismos de represión de la CD-E en la carcinogénesis.

Otro posible mecanismo de regulación de la actividad transcripcional de CD-E a través de la región GC, es la posible interacción entre SP1 y AP2 con miembros de la familia Ets. Este mecanismo se discutirá con más detalle en el siguiente Apartado.

2.1.3. Papel regulador negativo del sitio Ets.

Tanto los experimentos de footprinting *in vitro* y retardo en gel (Fig. 21 y 28) como los experimentos de footprinting *in vivo* (Fig. 34 y 35) sugieren la existencia de factores que se unen al promotor de CD-E, en la que hemos denominado región ECE, de forma diferencial en células que expresan y no expresan CD-E y que actuarían predominantemente en células CD-E positivas. La identificación del factor/factores que interaccionan con esta región como miembros de la familia Ets viene dada porque la mutación en el sitio EtsA que existe en esta región impide la unión de los factores al DNA (Fig. 29), y además tiene un efecto transcripcional en células CD-E positivas, induciendo un aumento en la actividad promotora (Fig. 30). Este último dato permite suponer que el papel del elemento Ets en estas líneas celulares es como modulador negativo de la transcripción.

El diferente patrón que muestran células CD-E positivas y negativas en experimentos de footprinting *in vitro* y de retardo en gel, sugiere que este elemento pueda tener alguna implicación en la expresión específica celular, y posiblemente también en la expresión específica epitelial. De hecho, se han caracterizado muy recientemente miembros de esta familia exclusivos de células epiteliales, como los factores ESE-1 y jen (Oettgen *et al.*, 1997; Andreoli *et al.*, 1997).

Se sabe que la mayoría de los factores tipo Ets establecen interacciones con otros factores de transcripción, en muchos casos con AP1, para ejercer su efecto transcripcional (ver Introducción, Apto. 6.3). Recientemente también se han encontrado promotores en los que Ets actúa interaccionando con el factor de transcripción SP1 (Gégonne *et al.*, 1993; Dittmer *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Ansieau *et al.*, 1997). Los experimentos de competición de la unión al oligonucleótido ECE mostrados en la Fig. 28C, junto con resultados no mostrados nos inclinan a pensar que en el promotor de CD-E factores tipo Ets están también actuando mediante interacción con otros factores de transcripción, posiblemente SP1 o AP2. Así, el complejo de retardo mayoritario formado con el oligonucleótido ECE se competía específicamente con los oligonucleótidos consenso para SP1 (SP1-SV40) y para AP2 (AP2-SV40) y también en parte con el oligonucleótido consenso de unión al factor CP1, pero no con otros oligonucleótidos probados irrelevantes o de unión a otros factores de transcripción (resultados no mostrados). Estos resultados, junto con los datos existentes en la literatura, sugieren que factores Ets están formando parte de grandes complejos transcripcionales, implicados en la regulación fina de la transcripción.

Por otro lado, se ha descrito que algunos factores de esta familia poseen un dominio inhibidor de la unión al DNA (Wasylyk *et al.*, 1992). Este hecho podría explicar la

competición por el oligonucleótido PEA 3 de la banda de mayor movilidad que aparece en la Fig. 28C, así como el hecho de que esta banda no se defina con claridad en todos los experimentos. Esta banda podría tratarse de un producto de degradación de Ets, quizás sin el dominio inhibidor, y tendría propiedades de unión al DNA diferentes respecto al factor completo que, además, estaría formando interacciones con otros factores nucleares. Por tanto, esta banda podría ser competida más fácilmente por un oligonucleótido consenso para factores Ets, aunque no por el oligonucleótido mutado.

Los intentos de identificación de factores Ets en experimentos de super-retardo, con un anticuerpo anti-Ets1, fueron fallidos. Sin embargo, se ha descrito que en otros sistemas celulares anticuerpos anti-Ets no interfieren siempre con la formación de complejos Ets transcripcionalmente activos (Lee *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1994).

Si el elemento Ets ejerce, como hemos indicado, un papel modulador negativo en líneas que expresan CD-E (Fig. 30), cabría esperar, por tanto, que la transfección de ERM indujera un descenso en la actividad transcripcional. Sin embargo, esto no ocurre así (Fig. 31). Una posible explicación para este hecho es que el factor ERM, exógeno, no es el inhibidor endógeno que está actuando, sino que tiene propiedades diferentes, y ERM está desplazando al inhibidor endógeno, liberando por tanto el efecto represor.

En este sentido, sería de gran utilidad conocer qué miembros de la familia Ets se expresan en los queratinocitos de ratón analizados. Los estudios de inmunoblot realizados (Fig. 32) no permiten distinguir entre los diferentes miembros de la familia y, además, el anticuerpo empleado no es capaz de detectar a todos los miembros de esta amplia familia. Por tanto, sería útil realizar ensayos de Northern-blot o de RT-PCR con sondas específicas para cada miembro de la familia. Es interesante destacar que Baert *et al.* (1997) han encontrado alta expresión de los miembros de la familia Ets, ERM y ER81 en líneas de carcinoma de mama que son CD-E negativas, mientras que otras líneas de carcinoma de mama que son CD-E positivas no muestran expresión de ninguno de estos dos factores. Si la presencia o ausencia de estos factores puede tener alguna consecuencia en la transcripción de CD-E aún está por determinar.

Por otra parte, los resultados mostrados en la figura 31 para la línea celular HaCa4, parecen indicar que factores de esta familia también pueden regular la actividad transcripcional en líneas CD-E negativas como HaCa4, pero a través de sitios diferentes al sitio EtsA. ERM también fue capaz de aumentar la actividad promotora de la construcción -58 en HaCa4 (resultados no mostrados). El análisis de secuencias contenidas en esta construcción indicó la presencia de otros sitios posibles de unión a Ets entre las posiciones +80 y +30, que unían proteínas nucleares en experimentos de retardo en gel (datos no mostrados) que quizás pudieran ser los responsables del efecto transcripcional ejercido por ERM en la línea HaCa4.

2.2. Promotor endógeno de CD-E. Mecanismos reguladores de su transcripción en queratinocitos de ratón.

El estudio de la metilación endógena del DNA en diferentes líneas celulares de queratinocitos de ratón indicó que el DNA está metilado en la región 5' del gen de CD-E en todas las líneas celulares analizadas (Fig. 33), independientemente de su nivel de expresión de CD-E. Estos resultados contrastan con los obtenidos por los grupos de Hirohashi y Baylin (Yoshiura *et al.*, 1995; Graff *et al.*, 1995) que observaron metilación endógena en la región 5' del gen de CD-E en líneas humanas de carcinomas desdiferenciados de distinto origen que no expresaban CD-E, pero no en líneas de carcinomas diferenciados, CD-E positivas, ni en tejido normal de mama. Además, estos autores observaron que algunas líneas eran capaces de expresar CD-E tras el tratamiento con el agente demetilante 5-azacitidina, por lo que sugieren que la metilación endógena del DNA alrededor de la región promotora de CD-E es uno de los mecanismos principales que reprimen su expresión en la carcinogénesis. Asimismo, el grupo de Birchmeier también observó metilación endógena en algunas líneas humanas de carcinoma CD-E negativas y en fibroblastos de ratón NIH3T3, pero no en líneas humanas de carcinoma CD-E positivas ni en una línea epitelial de glándula salivar de ratón, CSG (Hennig *et al.*, 1995). Sin embargo, también se había indicado que líneas de carcinoma de mama desdiferenciadas CD-E negativas mostraban menor grado de metilación que las diferenciadas (Frixen *et al.*, 1991). Esta, en general, aparente discordancia con nuestros resultados puede deberse a los diferentes sistemas experimentales empleados: nuestros estudios se centran en la carcinogénesis de piel, mientras que ninguno de los otros grupos estudió queratinocitos o pieles normales o tumorales. Por otra parte, Ji *et al.* (1997) aporta datos sobre la regulación del gen de CD-E humano que sugieren que el estado endógeno de metilación no es tan esencial para la expresión o no de la CD-E: en sus manos el tratamiento con 5-aza-citidina de líneas de carcinoma de mama CD-E negativas no induce la expresión de CD-E. En cambio, estos autores observaron que la región 5' proximal del gen de CD-E humano muestra actividad específica en ensayos de transfección transitoria en líneas de carcinoma de mama, indicando que durante la progresión tumoral existen alteraciones de los factores que actúan en trans, que conducen a la inhibición de la expresión de CD-E.

En cualquier caso la metilación del DNA, no tiene porqué estar siempre relacionada con represión transcripcional, y puede jugar variados papeles en la carcinogénesis (Counts y Goodman, 1995). Así, en algunos casos la metilación puede favorecer la expresión génica por un mecanismo de "imprinting", como ocurre en el gen de Igf2r (Stöger *et al.*, 1993). Otras veces, la metilación de algunos residuos CpG previene la metilación de islas CpG próximas, como ocurre en un sitio de unión a SP1 del promotor del gen "housekeeping" aprt (Macleod *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha demostrado que algunos factores, como SP1 (Höller *et al.*, 1988) o YY1 (Gaston y Fried, 1995), pueden unirse al DNA y activar la transcripción a pesar de que esté metilado. En este sentido, la metilación de la posición -56

del promotor de CD-E observada en el presente trabajo, que corresponde con la región rica en GC de unión a SP1 y AP2, en las líneas de queratinocitos analizadas (Fig. 33), no tiene porqué impedir la unión de dichos factores nucleares y de hecho esta posición se corresponde con un sitio de hipersensibilidad en los experimentos de footprinting *in vivo* (Fig. 34 y 35).

Por otro lado, los experimentos de footprinting *in vivo* (Fig. 34 y 35) muestran que los sitios de regulación postulados mediante ensayos *in vitro* o con un promotor exógeno están, en efecto, ocupados *in vivo* por factores, y esencialmente en células que expresan CD-E. El papel represor del elemento E-pal en células CD-E negativas se vería reflejado por la protección en estas líneas de la posición central de esta secuencia. Por otra parte, estos experimentos sugieren la existencia de otros posibles sitios reguladores. Destacan las posiciones -169/-167, -123/-126 y -117/-118, donde la existencia de sitios consenso de unión a factores Ets y SP1 hace pensar en la posibilidad de que estén actuando complejos mecanismos reguladores. Por otra parte, es sugerente la similitud de las secuencias protegidas -167/-169 y -117/-118 (GGAAGT).

Todos los resultados sobre el promotor de CD-E mostrados en esta Tesis, en conjunto, permiten hipotetizar sobre un modelo de regulación transcripcional de dicha molécula (Fig. 41). En células epiteliales, que expresan CD-E (Fig. 41A), factores de unión a la región GC (SP1 y AP2) y a la caja CCAAT, ejercerían un efecto transcripcional positivo, que estaría modulado por la interacción con factores tipo Ets. El factor de unión al elemento E-pal no sería capaz de bloquear la transcripción, probablemente debido a la naturaleza del complejo multitranscripcional formado por los otros factores.

Por otra parte, en células epiteloides o fusiformes, que representan estadios más avanzados de la progresión, y son CD-E negativas, el papel del elemento represor E-pal sería el predominante. En estas líneas también existen factores tipo SP1 y AP2, pero no se unen a la región rica en GC de forma endógena, quizás por la existencia de factores Ets con diferentes propiedades a los de las líneas CD-E positivas.

2.3. Mecanismos de regulación comunes y diferenciales de los promotores de CD-E y CD-P.

Los promotores de CD-E y CD-P son muy similares en sus secuencias (ambos carecen de caja TATA y poseen una región rica en GC y una caja CCAAT) y comparten mecanismos de regulación. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que se regulan además por mecanismos diferentes. En concreto podrían intervenir factores comunes tipo SP1 y CP1, a través de la región rica en GC y la caja CCAAT de ambos promotores, respectivamente. Específicamente en la regulación del promotor de CD-E participaría el factor de transcripción AP2 y factores tipo CP2 y C/EBP, también a través de la región rica en GC y caja CCAAT, respectivamente.

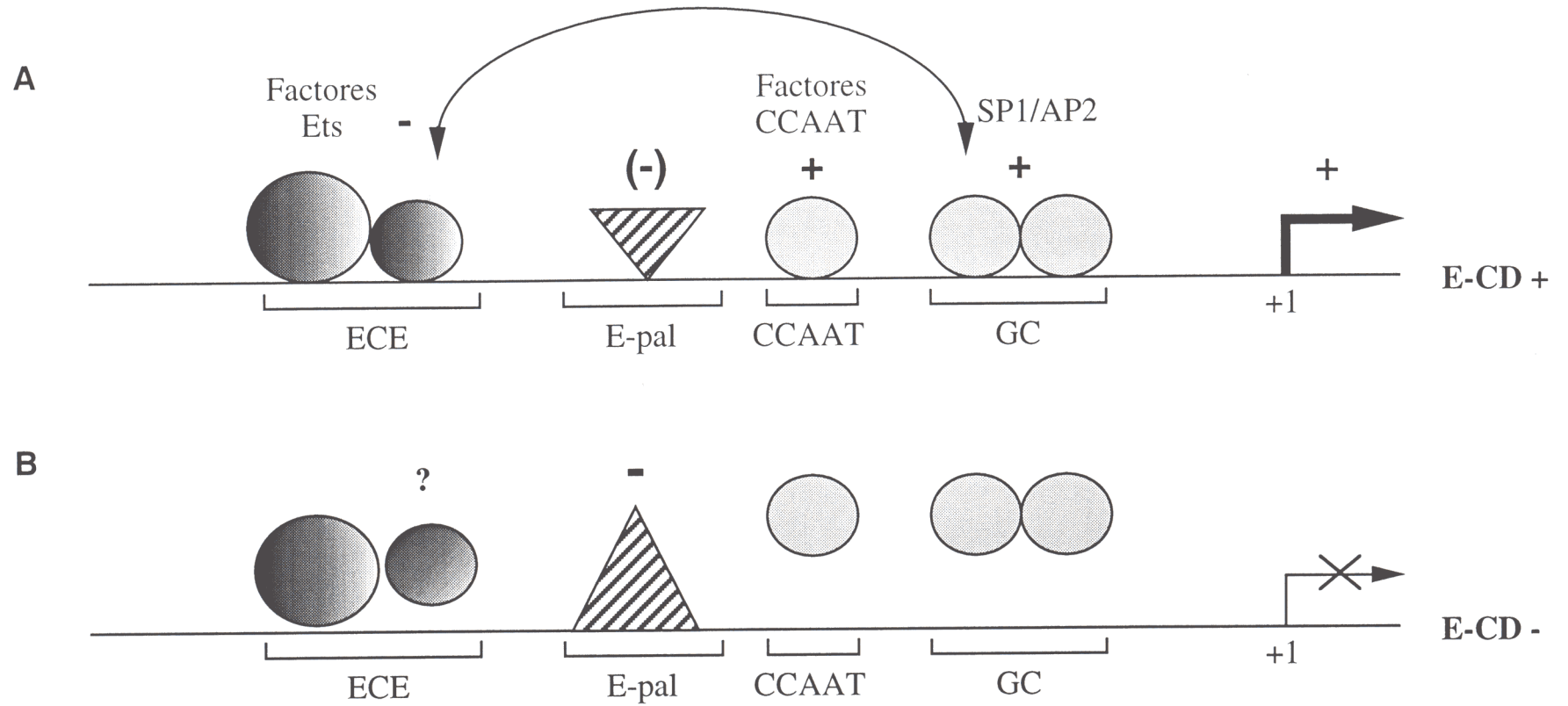


Figura 41. Modelo sobre la regulación del promotor de CD-E por factores nucleares. En la parte A de la figura se muestra un promotor de CD-E transcripcionalmente activo, mientras que en la parte B se muestra un promotor reprimido. Las figuras geométricas representan factores nucleares, que pueden unirse o no a la región promotora, con efecto activador (+) o represor (-). El modelo propuesto se ha elaborado a partir de los datos obtenidos en esta Tesis. Las posibles interacciones entre factores y los efectos que pueden tener se analizan en la Discusión con más detalle.

La diferente regulación de ambos promotores puede relacionarse con el diferente patrón de expresión que tienen ambos genes en la epidermis: CD-P restringida en la capa basal proliferativa y CD-E expresada en capas basales y suprabasales (Nose *et al.*, 1986; Fujita *et al.*, 1992).

La mayor complejidad de la regulación transcripcional de CD-E, con la existencia, por ejemplo, del elemento palindrómico E-pal, que tiene un papel represor predominante en células que no expresan CD-E, sugiere que este gen requiere una regulación muy fina, controlada por varios mecanismos. Además, los datos aportados en esta Tesis sugieren la participación de miembros de la familia Ets que formarían complejos transcripcionales capaces de modular la expresión de CD-E en los queratinocitos de ratón. En conjunto, todos estos resultados sugieren que no son los factores de transcripción aislados los que determinan el efecto transcripcional, sino la interacción de los factores entre sí y las interrelaciones que pueden establecer.

El conocimiento de estos mecanismos puede ser de utilidad para intervenir en los procesos tumorales donde existe pérdida de CD-E que, como se ha indicado, puede contribuir a la adquisición de un fenotipo tumoral más agresivo. Por otra parte, los mecanismos de pérdida de expresión de CD-E en la carcinogénesis podrían ser comunes con los que ocurren durante el desarrollo embrionario, en las transiciones epitelio-mesénquima y su conocimiento puede aportar nuevos datos sobre el control de la expresión durante el desarrollo, así como sobre mecanismos de expresión epitelio específica.

CONCLUSIONES

1. El bloqueo de la expresión de CD-E en la línea celular de queratinocitos de ratón E24, que es tumorigénica pero no metastásica, induce en la misma un fenotipo invasivo y metastásico sin alterar los niveles de v-Ha-ras.
2. La CD-E controla negativamente la actividad de la gelatinasa MMP-9 en líneas de queratinocitos de piel de ratón. Este aumento en la actividad MMP-9 puede ser el responsable de la mayor capacidad invasiva y metastásica que poseen las células cuando pierden la CD-E.
3. La región -178/+92, respecto del sitio de inicio de la transcripción, del gen de CD-E de ratón presenta actividad transcripcional específica en líneas de queratinocitos de ratón.
4. La región rica en GC del promotor de CD-E (-58/-32), que une los factores nucleares SP1 y AP2, y la caja CCAAT (-65), que une factores relacionados con CP1, CP2 o C/EBP, juegan un papel regulador positivo en la transcripción de CD-E, y están ocupadas *in vivo* por factores nucleares solamente en las líneas de queratinocitos que expresan CD-E.
5. El elemento palindrómico E-pal (posiciones -86/-75) controla la transcripción de forma negativa, siendo el efecto represor mucho más fuerte en las líneas que no expresan CD-E. *In vivo* la posición central de este elemento está ocupada en todas las líneas de queratinocitos estudiadas.
6. El elemento de unión a Ets de la posición -95 regula negativamente la transcripción en aquellas líneas analizadas que expresan CD-E, posiblemente mediante la interacción con otros factores o cofactores nucleares. Endógenamente esta región está ocupada de forma diferente por líneas que expresan y no expresan CD-E.
7. La represión o disminución de la expresión de CD-E en líneas de queratinocitos de ratón no es debida a metilación endógena de la región 5' proximal del gen de CD-E.
8. La regulación transcripcional de los genes de CD-E y CD-P en queratinocitos de ratón comparte mecanismos similares: regulación por SP1 y CP1, a través de las regiones rica en GC y caja CCAAT de ambos promotores, respectivamente. Sin embargo, mecanismos adicionales actúan sobre el promotor de CD-E, sugiriendo que la regulación transcripcional de esta molécula es más compleja.

BIBLIOGRAFIA

- Aberle, H., Schwartz, H. y Kemler, R.** (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61: 514-523.
- Adams, J. C. y Watts, F. M.** (1990). Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction of fibronectin binding precedes $\alpha 5\beta 1$ integrin loss from the cell surface. *Cell* 63: 425-435.
- Adams, J. C. y Watts, F. M.** (1991). Expression of $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$ integrins in human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J Cell Biol* 115: 829-841.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D.** En "Molecular Biology of the Cell", Third Ed. Garland Publishing Inc., New York, NY, 1994.
- Amagai, M., Fujimori, T., Masunaga, T., Shimizu, H., Nishikawa, T., Shimizu, N., Takeichi, M. y Hashimoto, T.** (1995). Delayed assembly of desmosomes in keratinocytes with disrupted classic-cadherin-mediated cell adhesion by a dominant negative mutant. *J Invest Dermatol* 104: 27-32.
- Amati, B. y Land, H.** (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Op Cell Biol* 4: 102-108.
- Andersen, B., Schonemann, M. D., Flynn, S. E., Pearse, R. V., Singh, H. y Rosenfeld, M. G.** (1993). Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2 related factors expressed in the epidermis. *Science* 260: 78-82.
- Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L. y Duffy, M. J.** (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72: 1-22.
- Andreoli, J. M., Jang, S. I., Chung, E., Coticchia, C. M., Steinert, P. M. y Markova, N. G.** (1997). The expression of a novel, epithelium-specific ets transcription factor is restricted to the most differentiated layers in the epidermis. *Nucleic Acids Res* 25: 4287-4295.
- Ansieau, S., Plaza, S., Ferreira, E., Dozier, C. y Stehelin, D.** (1997). Identification and analysis of chicken c-mil promoter: possible involvement of Sp1- and Ets-related proteins. *Genomics* 18: 537-545.
- Anzano, M. A., Byers, S. W., Smith, J. M., Peer, C. W., Mullen, L. T., Brown, C. C., Roberts, A. B. y Sporn, M. B.** (1994). Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res* 54: 4614-4617.
- Arnemann, J., Sullivan, K. H., Magee, A. I., King, I. A. y Buxton, R. S.** (1993). Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci.* 104: 741-750.
- Baert, J. L., Monte, D., Musgrove, E. A., Albagli, O., Sutherland, R. L. y de Launoit, Y.** (1997). Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 70: 590-597.
- Ballin, M., Gomez, E., Sinha, C. C. y Thorgeirsson, U. P.** (1988). Ras oncogene mediated induction of 92 kDa metalloproteinase: strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 832-838.
- Basbaum, C. B. y Werb, Z.** (1996). Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Op Cell Biol* 8: 731-738.
- Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C. y Chambon, P.** (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348: 699-704.

- Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J. R. and Hoffer, H. (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54: 3845-3852.
- Behrens, J., Birchmeier, W., Goodman, S. L. e Imhof, B. A. (1985). Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol* 101: 1307-1315.
- Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy F. y Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108: 2435-2447.
- Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. y Birchmeier, W. (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11495-11499.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M. M. y Birchmeier, W. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/ β -catenin complex in cells transformed with a temperature sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120: 757-766.
- Behrens, J., von Kries, J., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. y Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642.
- Benbrook, D. M. y Jones, N. C. (1994). Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res.* 22:1463-1469.
- Bernhard, E. J., Gruber, S. B. y Muschel, R. J. (1994). Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4293-4297.
- Bertolotti, D., Rutishauser, U. y Edelman, G. M. (1980). A cell surface molecule involved in aggregation of embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4931-4935.
- Berx, G., Cleton- Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van de Vijver, M, Cornelisse, C. y Van Roy, F. (1995a). E-cadherin is a tumor/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 14: 6107-6115.
- Berx, G., Staes, K., Van Hengel, J., Molemans, F., Bussemakers, M. J., Van Bokhoven, A. y Van Roy, F. (1995b). Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26: 281-289.
- Bickenbach, J. R., Greer, J. M., Bundman, D. S., Rothnagel, J. A. y Roop, D. R. (1995). Loricrin expression is coordinated with other epidermal proteins and the appearance of lipid lamellar granules in development. *J Invest Dermatol* 104: 405-410.
- Birchmeier, W. y Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198: 11-26.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W. y Brand, S. B. (1996). Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat* 156: 217-226.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Op Cell Biol* 7: 728-735.
- Bisswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Katoaka, H. y Nabeshima, K. (1995). The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIM) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55: 434-439.
- Blaschuk, O. W. y Farookhi, R. (1989). Estradiol stimulates cadherin expression in rat granulosa cells. *Dev Biol* 136: 564-567.

- Blaschuk, O. W., Sullivan, R., David, S. y Pouliot, Y.** (1990). Identification of a cadherin adhesion recognition sequence. *Dev Biol* 139: 227-229.
- Blasi, F.** (1993). Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *BioEssays* 15: 105-111.
- Boller, K., Vestweber, D. y Kemler, R.** (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 100:327-332.
- Brabant, G., Hoang-Vu, C., Cetin, Y., Dralle, H., Scheumann, G., Mölne, J., Hansson, G., Jansson, S., Ericson, L. E. y Nilsson, M.** (1993). E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 53: 4987-4993.
- Brabant, G., Hoang, V. C., Behrends, J., Cetin, Y., Potter, E., Dumont, J. E. y Maenhaut, C.** (1995). Regulation of the cell-cell adhesion protein, E-cadherin, in dog and human thyrocytes *in vitro*. *Endocrinology* 136: 3113-3119.
- Breen, E., Clark, A., Steele, G. y Mercurio, A. M.** (1993). Poorly differentiated colon carcinoma cell lines deficient in α -catenin expression express high levels of surface E-cadherin but lack Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion. *Cell Adh Commun* 1: 239-250.
- Brisette, J. L., Missero, C., Yuspa, S. H. y Dotto, G. P.** (1993). Different levels of v-Ha-ras expression in primary keratinocytes transformed with harvey sarcoma virus correlate with benign versus malignant behavior. *Mol Carcinog* 7: 21-25.
- Brooks, P., Strombal, S., Sanders, L., Von Schalscha, T., Aimes, R., Stetler-Stevenson, W., Quigley, J. y Cheresch, D.** (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to cell surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha\text{v}\beta 3$. *Cell* 85: 683-693.
- Brown, K., Quintanilla, M., Ramsden, M., Kerr, I. B., Young, S. y Balmain, A.** (1986). V-ras genes from Harvey- and BALB murine sarcoma virus can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* 46: 447-456.
- Buchmann, A., Ruggeri, B., Klein-Szanto, A. y Balmain, A.** (1991). Progression of squamous carcinoma cells to spindle carcinomas of mouse skin is associated with an imbalance of H-ras alleles on chromosome 7. *Cancer Res* 51: 4097-4101.
- Burns, P. A., Kemp, C. J., Gannon, J. V., Lane, D. P., Bremner, R. y Balmain, A.** (1991). Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6: 2363-2369.
- Bussemakers, M. J., van Moorselaar, R., Girolidi, L. A., Ichikawa, T., Isaacs, J. T., Takeichi, M., Debruyne, F. M. y Schalken, J. A.** (1992). Decreased expression of E-cadherin in the progression of rat prostatic cancer. *Cancer Res* 52: 2916-2922.
- Bussemakers, M. J., Girolidi, L. A., van Bokhoven A. y Schalken, J. A.** (1994a). Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1284-1290.
- Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., Völler, M., Smit, F. P. y Schalken, J. A.** (1994b). The genes for the calcium-dependent cell adhesion molecules P- and E-cadherin are tandemly arranged in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1291-1294.
- Butz, S., Stappert, J., Weissig, H. y Kemler, R.** (1992). Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related [letter]. *Science*. 257:1142-1144.
- Butz, S. y Kemler, R.** (1994). Distinct cadherin-catenin complexes in Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion. *Febs Lett.* 355:195-200.

- Buxton, R. S., Cowin, P., Franke, W. W., Garrod, D. R., Green, K. K., King, I. A., Koch, P. J., Magee, A. I., Rees, D. A., Stanley, R. S. y Steinberg, M. S. (1993). Nomenclature of desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 121: 481-483.
- Byrne, C. (1997). Regulation of gene expression in developing epidermal epithelia. *BioEssays* 19: 691-698.
- Canete-Soler, R., Litzky, L., Lubensky, I. y Muschel, R. J. (1994). Localization of the 92kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 144: 518-527.
- Cano, A., Gamallo, C., Kemp, C. J., Benito, N., Palacios, J., Quintanilla, M. y Balmain, A. (1996). Expression pattern of the cell adhesion molecules E-cadherin, P-cadherin and $\alpha 6\beta 4$ integrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient mice. *Int J Cancer* 65: 254-262.
- Cao, J., Sato, H., Takino, T. y Seiki, M. (1995). The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem* 270: 801-805.
- Carruba, G., Miceli, D., D'Amico, D., Farruggio, R., Comito, L., Montesanti, A., Polito, L. y Castagnetta, L. A. (1995). Sex steroids up-regulate E-cadherin expression in hormone-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 624-631.
- Caulín, C., Bauluz, C., Gandarillas, A., Cano, A. y Quintanilla, M. (1993). Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Exp Cell Res* 204: 11-21.
- Caulín, C., López-Barcons, L., González-Garrigues, M., Navarro, P., Lozano, E., Rodrigo, I., Gamallo, C., Cano, A., Fabra, A. y Quintanilla, M. (1996). Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin and correlated with reduced Ha-ras oncogene products. *Mol Carcinog* 15: 104-114.
- Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell* 53: 3-4.
- Chambers, A. F. y Tuck, A. B. (1993). Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev Oncol* 4: 95-114.
- Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P. y Dolle, P. (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 54: 83-94.
- Chen, T. T., Wu, R. L., Castro-Munozledo, F. y Sun, T. T. (1997). Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 17: 3056-3064.
- Chitaev, N. A. y Troyanovsky, S. M. (1997). Direct Ca^{2+} -dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 138: 193-201.
- Chodosh, L. A., Baldwin, A. S., Carthew, R. W. y Sharp, P. A. (1988). Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 53: 11-24.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Counts, J. L. y Goodman, J. I. (1995). Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell* 83: 13-15.
- Courtois, S. J., Lafontaine, D. A., Lemaigre, F. P., Durviaux, S. M. y Rousseau, G. G. (1990). Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acid Res* 18: 57-64.

- Cowin, P. y Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Op Cell Biol* 8: 56-65.
- Cunningham, B. A. (1995). Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr Op Cell Biol* 7: 628-633.
- Dahl, U., Sjödin, A. y Semb, H. (1996). Cadherins regulate aggregation of pancreatic β -cells *in vivo*. *Development* 122: 2895-2902.
- Davies, J. A. y Garrod, D. R. (1997). Molecular aspects of the epithelial phenotype. *BioEssays* 19: 699-704.
- DeClerk, Y., Perez, N., Shimada, H., Boone, T., Langley, K. y Taylor, S. (1992). Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 52: 701-708.
- Díaz-Guerra, M., Haddow, S., Bauluz, C., Jorcano, J. L., Cano, A., Balmain, A. y Quintanilla, M. (1992). Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alterations. *Cancer Res* 52: 680-687.
- Dittmer, J., Gégonne, A., Gitlin, S. D., Ghysdael, J. y Brady, J. N. (1994). Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through and inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem* 269: 21428-21434.
- D'Souza, B. y Taylor-Papadimitriou J. (1994). Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7202-7206.
- Edelman, G. M., Murray, B. A., Mege, R., Cunningham, B. A. y Gallin, W. J. (1987). Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecules after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8502-8506.
- Edwards, D. R., Waterhouse, P., Holman, M. L. y Denhardt, D. T. (1986). A growth-responsive gene (16C8) in normal mouse fibroblast homologous to a human collagenase inhibitor with erythroid-potentiating activity: evidence for inducible and constitutive transcripts. *Nucleic Acid Res* 14: 8863-8878.
- Eistetter, H. R., Adolph, S., Ringwald, M., Simon-Chazotte, D., Schuh, R., Guenet, J. L. y Kemler, R. (1988). Chromosomal mapping of the structural gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3489-3493.
- Ellis, R. W., DeFeo, D., Maryak, J. M., Young, H. A., Shih T. Y., Chang, E. H., Lowy, D. R. y Scolnick E.M. (1980). Dual evolutionary origin for the rat genetic sequences of Harvey murine sarcoma virus. *J Virol* 36: 408-420.
- Ewing, C. M., Ru, N., Morton, R. A., Robinson, J. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Barrett, J. C. e Isaacs, W. B. (1995). Chromosome 5 suppresses tumorigenicity of PC3 prostate cancer cells: correlation with re-expression of α -catenin and restoration of E-cadherin function. *Cancer Res* 55: 4813-4817.
- Fabre, M. y García de Herreros, A. (1993). Phorbol ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cancer cells is associated with down-regulation of E-cadherin. *J Cell Sci* 106: 513-522.
- Fafeur, V., Tulasne, D., Quéva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X. y Vandembunder, B. (1994). The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Diff* 8: 655-665.
- Fagotto, F., Funayama, N., Glück, U. y Gumbiner, B. M. (1996). Binding of cadherins antagonizes the signaling activity of β -catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 132: 1105-1114.

- Fannon, A. M., Sherman, D. L., Ilyina-Gragerova, G., Brophy, P. J., Friedrich, V. J. y Colman, D. R.** (1995). Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol* 129: 189-202.
- Faraldo, M. L. y Cano, A.** (1993). The 5' flanking sequences of the mouse P-cadherin gene. Homologies to 5' sequences of the E-cadherin gene and identification of a first 215 base-pair intron. *J Mol Biol* 231: 935-941.
- Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. y Cano, A.** (1997). Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20: 33-47.
- Faus, I., Hsu, H. y Fuchs, E.** (1994). Oct-6: a regulator of keratinocyte gene expression in stratified squamous epithelia. *Mol Cell Biol* 14: 3263-3275.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
- Fisher, C. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z-Q., Varani, J., Kang, S. y Vorhees, J. J.** (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature* 379: 335-339.
- Franklin, J. I. y Sargent, T. D.** (1996). Ventral neural cadherin, a novel cadherin expressed in a subset of neural tissues in the zebrafish embryo. *Dev Dyn*. 206:121-130.
- Freije, J. M. P., Díez-Ita, I., Balbín, M., Sánchez, L. M., Blanco, R., Tolivia, J. y López-Otín, C.** (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766-16773.
- Frisch, S. M.** (1994). E1a induces the expression of epithelial characteristics. *J Cell Biol* 127: 1085-1096.
- Frisch, S. M.** (1997). The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *BioEssays* 19: 705-709.
- Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D. y Birchmeier, W.** (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113: 173-185.
- Frixen, U. H. y Nagamine, Y.** (1993). Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res* 53: 3618-3623.
- Fuchs, E.** (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111: 2807-2814.
- Fuchs, E. y Byrne, C.** (1994). The epidermis: rising to the surface. *Curr Op Genet Dev* 4: 725-736.
- Fujimori, T., Miyatani, M. y Takeichi, M.** (1990). Expression of N-cadherin perturbs histogenesis in *Xenopus* embryos. *Development* 110: 97-104.
- Fujimoto, J., Ichigo, S., Hori, M., Morishita, S. y Tamaya, T.** (1996). Progestins and danazol effect on cell-to-cell adhesion and E-cadherin and α - and β -catenin mRNA expressions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57: 275-282.
- Fujita, M., Furukawa, F., Fujii, K., Horiguchi, Y., Takeichi, M. e Imamura, S.** (1992). Expression of cadherin cell adhesion molecules during human skin development: morphogenesis of epidermis, hair follicles and eccrine sweat ducts. *Arch Dermatol Res*. 284:159-166.
- Funayama, N., Fagoto, F., McCrea, P. y Gumbiner, B. M.** (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of β -catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol* 128: 959-968.
- Fuse, N., Hirose, S. y Hayashi, S.** (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev* 8: 2270-2281.

- Gamallo, C., Palacios, J., Suárez, A., Pizarro, A., Navarro, P., Quintanilla, M. y Cano, A. (1993). Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinomas. *Am J Pathol* 142: 987-993.
- Gamallo, C., Palacios, J., Benito, N., Limeres, M. A., Pizarro, A., Suárez, A., Pastrana, F., Cano, A. y Calero, F. (1996). Expression of E-cadherin in 230 infiltrating ductal breast carcinoma: relationship to clinicopathological features. *Int J Oncol* 9: 1207-1212.
- Gandarillas, A. y Watt, F. M. (1995). Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* 11: 1403-1407.
- Garbisa, S., Pozzatti, R. O., Mushel, R. J., Saffioti, U., Ballin, M., Goldfarg, R. H., Khoury, G. y Liotta, L. A. (1987). Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. *Cancer Res* 47: 1523-1528.
- Garret-Sinha, L. A., Eberspaecher, H., Seldins, M. F. y de Crombrughe, B. (1996). A gene for a novel zinc-finger protein expressing in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 271: 31384-31390.
- Garrod, D. R. (1993). Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Op Cell Biol* 5: 30-40.
- Gaston, K. y Fried, M. (1995). CpG methylation has differential effects on the binding of YY1 and ETS proteins to the bi-directional promoter of the Surf-1 and Surf-2 genes. *Nucleic Acid Res* 23: 901-909.
- Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A. y Ghysdael, J. (1993). Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J* 12: 1169-1178.
- Giménez-Conti, I., Aldaz, C. M., Bianchi, A. B., Roop, D. R., Slaga, T. J. y Conti, C. J. (1990). Early expression of type I K13 keratin in the progression of mouse skin papillomas. *Carcinogenesis* 11: 1995-1999.
- Gómez, M., Navarro, P., Quintanilla, M. y Cano, A. (1992). Expression of $\alpha 6\beta 4$ integrin increases during malignant conversion of mouse epidermal keratinocytes: association of the $\beta 4$ subunit to the cytokeratin fraction. *Exp Cell Res* 201: 250-261.
- Gómez, M., Navarro, P. y Cano, A. (1994). Cell adhesion and tumor progression in mouse skin carcinogenesis: increased synthesis and organization of fibronectin is associated with the undifferentiated spindle phenotyp. *Invasion & Metastasis* 14: 17-26.
- Gómez, M. y Cano, A. (1995). Expression of $\beta 1$ integrin receptors in transformed mouse epidermal keratinocytes: upregulation of $\alpha 5\beta 1$ in spindle carcinoma cells. *Mol Carcinog* 12: 153-165.
- Goomer, R. S., Holst, B. D., Wood, I. C., Jones, F. S. y Edelman, G. M. (1994). Regulation *in vitro* of an L-CAM enhancer by homeobox genes HoxD9 and H-NF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7985-7989.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. y Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2: 1044-1051.
- Graff, J. R., Herman, J. G., Lapidus, R. G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D. F., Isaacs, W. B., Pitha, P. M., Davidson, N. E. y Baylin, S. B. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55: 5195-5199.
- Grignani, F., Lombardi, L., Inghirami, G., Sternas, L., Cechova, K. y Dalla-Favera, R. (1990). Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells. *EMBO J* 9: 3913-3922.
- Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M. y Boyd, D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by *ras* is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* 271: 10672-10680.

- Gumbiner, B. M.** (1990). Generation and maintenance of epithelial cell polarity. *Curr Op Cell Biol* 2: 881-887.
- Gumbiner, B. M.** (1995). Signal transduction by β -catenin. *Curr Op Cell Biol* 7: 634-640.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.
- Gutman, A. y Wasylyk, B.** (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* 7: 2241-2246.
- Hamaguchi, M., Matsuyoshi, N., Ohnishi, Y., Gotoh, B., Takeichi, M. y Nagai, Y.** (1993). p60src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J* 12: 307-314.
- Harlow, E. y Lane, D.** (1988). Cell staining. En *Antibodies. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, N. Y., pp. 359-421.
- Hashimoto, M., Niwa, O., Nitta, Y., Takeichi, M. y Yokoro, K.** (1989). Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 80: 459-63.
- Hatta, K., Okada, T. S. y Takeichi, M.** (1985). A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissue: possible role of its target antigen in animal pattern formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2789-2793.
- Hatta, M., Miyatani, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. y Takeichi, M.** (1991). Genomic organization and chromosomal mapping of the mouse P-cadherin gene. *Nucleic Acids Res* 19: 4437-4441.
- Hatta, M. y Takeichi, M.** (1994). Complex cell type-specific transcriptional regulation of the promoter and an intron of the mouse P-cadherin gene. *Dev Growth & Diff* 36: 509-519.
- Hay, E. D.** (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 154:8-20.
- Hennig, G., Behrens, J., Truss, M., Frisch, S., Reichmann, E. y Birchmeier, W.** (1995). Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter *in vivo*. *Oncogene* 11: 475-484.
- Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. y Behrens, J.** (1996). Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem* 271: 595-602.
- Hennighausen, L. y Lubon, H.** (1987). Interaction of proteins with DNA *in vitro*. *Methods Enzymol* 152: 721-735.
- Hermiston, M. I. y Gordon, J. I.** (1995a). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270: 1203-1206.
- Hermiston, M. I. y Gordon, J. I.** (1995b). *In vivo* analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 129: 489-506.
- Hermiston, M. L., Wong, M. H. y Gordon, J. I.** (1996). Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev* 10: 985-996.
- Herrenknecht, K., Ozawa, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Lenter, M. y Kemler, R.** (1991). The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:9156-9160.

- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. y Nelson, W. J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 125:1327-1340.
- Hirai, Y., Nose, A., Kobayashi, S. y Takeichi, M. (1989a). Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. I Lung epithelial morphogenesis. *Development* 105: 263-270.
- Hirai, Y., Nose, A., Kobayashi, S. y Takeichi, M. (1989b). Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II Skin morphogenesis. *Development* 105: 271-277.
- Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. y Takeichi, M. (1992). Identification of neural α -catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 70: 293-301.
- Hodivala, K. J. y Watt, F. M. (1994). Evidence that cadherins play a role in the downregulation of integrin expression that occurs during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol* 124: 589-600.
- Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Y., Jameson, J. L. y Habener, J. F. (1988). Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science*. 242:1430-1433.
- Hoffman, I. y Balling, R. (1995). Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin. *Dev Biol* 169: 337-346.
- Höller, M., Westin, G., Jiricny, J. y Shaffner, W. (1988). Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 2: 1127-1135.
- Hoppe-Seyler, F. y Butz, K. (1994). Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. *Mol Carcinog* 10: 134-141.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H. y Kemler, R. (1994). β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127: 1375-80.
- Huber, O., Bierkamp, C. y Kemler, R. (1996a). Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 8: 685-691.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G. y Kemler, R. (1996b). Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59: 3-10.
- Hulsken, J., Birchmeier, W. y Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol*:2061-2069.
- Hurlin, P. J., Foley, K. P., Ayer, D. E., Eisenman, R. N., Hanahan, D. y Arbeit, J. M. (1995a). Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. *Oncogene* 11: 2487-2501.
- Hurlin, P., Quéva, C., Koskinen, P. J., Steingrimson, E., Ayer, D. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. y Eisenman, R. N. (1995b). Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J* 14: 5646-5659.
- Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C. y Jacob, F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*. 21:927-934.
- Hyafil, F., Babinet, C. y Jacob, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 21: 927-934.
- Imagawa, M., Chiu, R. y Karin, M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two-different signal transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51: 251-260.

- Imhof, B. A., Vollmers, H. P., Goodman, S. L. y Birchmeier, W.** (1983). Cell-cell interactions and polarity of epithelial cells: specific perturbation using monoclonal antibody. *Cell*, 667-75.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J.** (1990). *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, pp. 177-183
- Iwamoto, T., Taniguchi, M., Asai, N. Ohkusu, K., Nakashima, I. y Takahashi, M.** (1993). cDNA cloning of mouse ret proto-oncogen and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* 8: 1087-1091.
- Jackson, S. P., MacDonald, J. J., Lees-Miller, S. y Tjian, R.** (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63: 155-165.
- Jensen, P. J. y Wheelock, M. J.** (1992). Regulation of urokinase plasminogen activator localization in keratinocytes by calcium ion and E-cadherin. *Exp Cell Res* 202: 190-198.
- Ji, X., Woodard, A. S., Rimm, D. L. y Fearon, E. R.** (1997). Transcriptional defects underlie loss of E-cadherin expression in breast cancer. *Cell Growth Differ* 8: 773-778.
- Jiang, W. G., Hiscox, S., Hallett, M. B., Horrobin, D. F., Mansel, R. E. y Puntis, M. C.** (1995). Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linoleic acid (GLA). *Cancer Res* 55: 5043-5048.
- Juarez, J., Clayman, G., Nakajima, M., Tanabe, K. K., Saya, H., Nicholson, G. L. y Boyd, D. A.** (1991). Role and regulation of expression of 92-kDa type-IV collagenase (MMP-9) in two invasive squamous cell carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int J Cancer* 55: 10-18.
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. y Tjian, R.** (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51: 1079-1090.
- Kanai, Y., Ochiai, A., Shibata, T., Oyama, T., Ushijama, S., Akimoto, S. e Hirohashi, S.** (1995). c-erbB-2 gene product directly associates with β -catenin and plakoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 1067-1071.
- Katagiri, A., Watanabe, R. y Tomita, Y.** (1995). E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br J Cancer* 71: 376-379.
- Kawanishi, J., Kato, J., Sasaki, K., Fujii, S., Watanabe, N. y Niitsu, Y.** (1995). Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the β -catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Mol Cell Biol* 15: 1175-1181.
- Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S. y Fujinaga, K.** (1996). A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* 12: 221-227.
- Kemler, R., Babinet, C., Eisen, H. y Jacob, F.** (1977). Surface antigen in early differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4449-4452.
- Kemler, R., Ozawa, M. y Ringwald, M.** (1989). Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 1:892-897.
- Kemler, R.** (1992). Classical cadherins. *Semin Cell Biol*. 3:149-155.
- Kemler, R.** (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *TIG* 9: 317-321.
- Khokha, R.** (1994). Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells *in vivo* by the overexpression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 86: 299-304.

- Kintner, C. (1992). Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 69: 225-236.
- Kitajima, I., Kawahara, K., Hanyu, N., Shin, H., Tokioka, T., Soejima, Y., Tsutsui, J., Ozawa, M., Shimayama, T. y Maruyama, I. (1996). Enhanced E-cadherin expression and increased calcium-dependent cell-cell adhesion in human T-cell leukemia virus type I Tax-expressing PC12 cells. *J Cell Sci* 109: 609-617.
- Kleiner, D. E. y Stetler-Stevenson, G. (1993). Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Op Cell Biol* 5: 891-897.
- Klein-Szanto, A. J. P. (1991). Tumor progression in experimental animals. *J Cancer Res Clin Oncol*, supp. II, 117: S71.
- Klingensmith, J. y Nusse, R. (1994). Signaling by wingless in *Drosophila*. *Dev Biol* 166: 396-414.
- Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R. y Wheelock, M. J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* 130:67-77.
- Knust, E. y Leptin, M. (1996). Adherens junctions in the *Drosophila* embryo: the role of E-cadherin in their establishment and morphogenetic function. *BioEssays* 18: 609-612.
- Koch, P. J., Walsh, M. J., Schmelz, M., Goldschmidt, M. D., Zimbelman, R. y Franke, W. W. (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* 53: 1-12.
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S. y Seth, A. (1993). The *Ets1* transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7588-7592.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275: 1784-1787.
- Kowalczyk, A. P., Palka, H. L., Luu, H. H., Nilles, L. A., Anderson, J. E., Wheelock, M. J. y Green, K. J. (1994). Posttranslational regulation of plakoglobin expression. Influence of the desmosomal cadherins on plakoglobin metabolic stability. *J Biol Chem* 269:31214-23.
- Kühl, M. y Wedlich, D. (1997). Wnt signalling goes nuclear. *BioEssays* 19: 101-104.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larcher, F., Bauluz, C., Díaz-Guerra, M., Quintanilla, M., Conti, C. J., Ballestin, C. y Jorcano, J. L. (1992). Aberrant expression of simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol Carcinog* 6: 112-121.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. y Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8263-8267.
- Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M. y Kemler, R. (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development* 122: 3185-3194.
- de Launoit, Y., Baert, J. L., Chotteau, A., Monte, D., Defosse, P. A., Coutte, L., Pelczar, H. y Leeders, F. (1997). Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. *Biochem Mol Med* 6: 127-135.
- Leask, A., Byrne, C. y Fuchs, E. (1991). Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7948-7952.

Lee, S. W. (1996). H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med.* 2:776-782.

Lee, J. H., Jang, S. I., Yang, J. M., Markova, N. G. y Steinert, P. M. (1996). The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. Stratified squamous epithelial-specific expression in cultured cells is mediated by binding of Sp1 and *ets* transcription factors to a proximal promoter. *J Biol Chem* 271: 4561-4568.

Legan, P. K., Yue, K. K. M., Chidgey, M. A. J., Holton, J. L., Wilkinson, R. W. y Garrod, D. R. (1994). The bovine desmocollin family: a new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biol* 126: 507-518.

Leube, R. E., Bader, B. L., Bosch, F. X., Zimbelmann, R., Achtstaetter, T. y Franke, W. W. (1988). Molecular characterization and expression of the stratification-related cytokeratins 4 and 15. *J Cell Biol* 106: 1249-1261.

Liotta, L. A., Rao, C. N. y Barsky, S. H. (1983). Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49: 636-649.

Luna, S., Soria, I., Pulido, D., Ortín, J. y Jiménez, A. (1988). Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene* 62: 121-126.

MacCalman, C. D., Farookhi, R. y Blaschuk, O. W. (1994). Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary. *Clin Exp Metastasis* 12: 276-282.

MacDougall, J. R., Bani, M. R., Lin, Y., Rak, J. y Kerbel, R. S. (1995). The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res* 55: 4171-4178.

Mack, D. H. y Laimins, L. A. (1991). A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9102-9106.

Macleod, K., Leprince, D. y Stehelin, D. (1992). The *ets* gene family. *TIBS* 17: 251-256.

Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J. y Bird, A. P. (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8: 2282-2292.

Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J. y Goodman, C. S. (1991). The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell*. 67:853-868.

Mansouri, A., Spurr, N., Goodfellow, P. N. y Kemler, R. (1988). Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation* 38: 67-71.

Mareel, M. M., Behrens, J., Birchmeier, W., De Bruyne, G., Vleminckx, K., Hoogewijs, A., Fiers, W. C. y Van Roy, F. (1991). Down-regulation of E-cadherin expression in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int J Cancer* 47: 922-928.

Marrs, J. A., Andersson-Fisone, C., Jeong, M. C., Cohen-Gould, L., Zurzolo, C., Nabi, I. R., Rodriguez-Boulán, E. y Nelson, W. J. (1995). Plasticity in epithelial cell phenotype: modulation by expression of different cadherin cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 129: 507-519.

Marrs, J. A. y Nelson, J. W. (1996). Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol* 165: 159-205.

Matrisian, L. M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG* 6: 121-126.

- Matsuyoshi, N., Hamaguchi, M., Taniguchi, S., Nagafuchi, A., Tsukita, S. y Takeichi, M.** (1992). Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118: 703-714.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C. y Alberga, A.** (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acid Res* 17: 3951-3957.
- Mayer, B., Johnson, J. P., Leidl, F., Jauch, K. W., Heiss, M. M., Schildberg, F. W., Birchmeier, W. y Funke, I.** (1993). E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 53: 1690-5.
- Mazzieri, R., Masiero, L., Zanetta, L., Monea, S., Onisto, M., Garbisa, S. y Mignatti, P.** (1997). Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* 16: 2319-2332.
- Mbalaviele, G., Dunstan, C. R., Sasaki, A., Williams, P. J., Mundy, G. R. y Yoneda, T.** (1996). E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastasis in an experimental metastasis model. *Cancer Res* 56: 4063-4070.
- McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R. y Nelson, W. J.** (1990). Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62: 309-316.
- Meier, P., Koedood, M., Philip, J., Fontana, A. y Mitchell, P. J.** (1995). Alternative mRNAs encode multiple isoforms of transcription factor AP-2 during murine embryogenesis. *Dev Biol* 169: 1-14.
- Miyaki, M., Tanaka, K., Kikuchi, Y. R., Muraoka, M., Konishi, M. y Takeichi, M.** (1995). Increased cell-substratum adhesion and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11: 2547-2552.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. y Clevers, H.** (1996). Xtc3 transcription factor mediates b-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86: 391-399.
- Monté, D., Baert, J. L., Defosse, P. A., de Launoit, Y. y Stéhelin, D.** (1994). Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene* 9: 1397-1406.
- Moon, R. T.** (1993). In pursuit of the functions of the Wnt family of developmental regulators: Insight from *Xenopus*. *BioEssays* 15: 91-97.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. y Kinzler, K. W.** (1997). Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790.
- Moser, M., Ruschoff, J. y Buettner, R.** (1997). Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 208: 115-124.
- Mueller, P. R. y Wold, B.** (1989). *In vivo* footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246: 780-786.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B. y Polakis, P.** (1995). Regulation of β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3046-3050.
- Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K. y Takeichi, M.** (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329: 341-343.
- Nagafuchi, A. y Takeichi, M.** (1988). Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7:3679-3684.

- Nagafuchi, A., Takeichi, M. y Tsukita, S. (1991). The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65:849-857.
- Nagar, B., Overduim, M., Ikura, M. y Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced-E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380: 360-364.
- Nakagawa, H., Inomoto, T. y Rustgi, A. K. (1997). A CACCC box-like cis-regulatory element of the Epstein-Barr virus ED-L2 promoter interacts with a novel transcription factor in tissue-specific squamous epithelia. *J Biol Chem* 272: 16688-16699.
- Nakajima, M., Welch, D. R., Wynn, D. M., Tsuruo, T. y Nicholson, G. L. (1993). Serum and plasma Mr 92.000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 1362 NF mammary carcinoma. *Cancer Res* 53: 5802-5807.
- Navarro, P., Gómez, M., Pizarro, A., Gamallo, C., Quintanilla, M. y Cano, A. (1991). A role for the cell-cell adhesion molecule E-cadherin during tumor progression in mouse skin carcinogenesis. *J Cell Biol* 115: 517-33.
- Navarro, P., Lozano, E. y Cano, A. (1993). Expression of E- or P-cadherin is not sufficient to modify the morphology and tumorigenic behavior of murine spindle carcinoma cells. Possible involvement of plakoglobin. *J Cell Sci* 105: 923-934.
- Nicholson, L. J., Pei, X. F. y Watt, F. M. (1991). Expression of E-cadherin, P-cadherin and involucrin by normal and neoplastic keratinocytes in culture. *Carcinogenesis* 12: 1345-1349.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. y Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science* 264: 835-838.
- Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6: 454-457.
- Nose, A. y Takeichi, M. (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression pattern associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 103: 2649-2658.
- Nose, A., Nagafuchi, A. y Takeichi, M. (1987). Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *EMBO J.* 6:3655-3661.
- Nose, A., Nagafuchi, A. y Takeichi, M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54: 993-1001.
- Nose, A., Tsuji, K. y Takeichi, M. (1990). Localization of specific determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61: 147-155.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. y Takeichi, M. (1994a). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with Armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* 165: 716-726.
- Oda, T., Kanai, Y., Oyama, T., Yoshiura, K., Shimoyama, Y., Birchmeier, W., Sugimura, T. e Hirohashi, S. (1994b). E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1858-1862.
- Oettgen, P., Alani, R. M., Barcinski, M. A., Brown, L., Akbarali, Y., Boltax, J., Kunsch, C., Munger, K. y Libermann, T. A. (1997). Isolation and characterization of a novel epithelium-specific transcription factor, ESE-1, a member of the *ets* family. *Mol Cell Biol* 17: 4419-4433.
- Ogata, Y., Enghild, J.J. y Nagase, H. (1992). Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor of the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267: 3581-3584.
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Takara, H., Tamura, S., Miyata, M., Doli, Y., Iihara, K., Matsuyoshi, N. e Hirano, S. (1992). Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in gastric carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421: 149-156

- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S., Takeichi, M. y Mori, T. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecule in human breast cancer tissues and its relation to metastasis. *Cancer Res* 53: 1696-1701.
- Okada, A., Bellocq, J-P., Rouyer, N., Chenard, M-P., Rio, M-C., Chambon, P. y Basset, P. (1996). Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast and head and neck carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2730-2734.
- Ostrowski, L. E., Finch, J., Krieg, P., Matrisian, L. M., Patskan, G., O'Connell, J. F., Phillips, J., Slaga, T. J., Breatnach, R. y Bowden, G. T. (1988). Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. *Mol Carcinog* 1: 13-19.
- Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M. e Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267: 386-389.
- Oyama, T., Kanai, Y., Ochiai, A., Akimoto, S., Oda, T., Yanagihara, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Shibamoto, S., Ito, F., Takeichi, M., Matsuda, H. e Hirohashi, S. (1994). A truncated β -catenin disrupts the interaction between E-cadherin and α -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res* 54: 6282-6287.
- Ozawa, M., Baribault, H. y Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8: 1711-7.
- Ozawa, M., Engel, J. y Kemler, R. (1990). Single amino acid substitutions in one Ca^{2+} binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* 63:1033-1038.
- Papkoff, J., Rubinfeld, B., Schryver, B. y Polakis, P. (1996). Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* 16: 2128-2134.
- Parker, A. E., Wheeler, G. N., Arnemann, J., Pidsley, S. C., Ataliotis, P., Thomas, C. L., Rees, D. A., Magee, A. I. y Buxton, R. S. (1991). Desmosomal glycoproteins II and III. Cadherin-like junctional molecules generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 266:10438-10445.
- Peifer, M., McCrea, P., Green, K. J., Wieschaus, E. y Gumbiner, B. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins β -catenin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* 118: 681-691.
- Peifer, M., Pai, L.-M. y Casey, M. (1994). Phosphorylation of the *Drosophila* adherens junction protein armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol* 166: 543-556.
- Pendas, A. M., Balbín, M., Llano, E., Jiménez, M. G. y López-Otín, C. (1997). Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* 40: 222-233.
- Peyrieras, N., Louvard, D. y Jacob, F. (1985). Characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies directed against uvomorulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8067-8071.
- Pizarro, A., Benito, N., Navarro, P., Palacios, J., Cano, A., Quintanilla, M., Contreras, F. y Gamallo, C. (1994). E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br J Cancer* 69:157-162.
- Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R. y Engel J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223:1019-1026.
- Portella, G., Liddell, J., Crombie, R., Haddow, S., Clarke, M., Stoler, A. B. y Balmain, A. (1994). Molecular mechanisms of invasion and metastasis during mouse skin tumour progression. *Invasion & Metastasis* 14: 7-16.

- Rajasekaran, A. K., Hojo, M., Huima, T y Rodriguez-Boulán, E.** (1996). Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol* 132: 451-463.
- Rave, N., Crevenjacob, R. y Baedfker, H.** (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzylomethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acid Res* 11: 3559-3567.
- Redies, C. y Takeichi, M.** (1996). Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev Biol* 180: 413-423.
- Reeves, R. y Nissen, M. S.** (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265: 8573-8582.
- Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E. M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M. y Beug, H.** (1992). Activation of an inducible cFosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 71: 1103-1116.
- Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I. y Tyggvason, K.** (1994). High expression of 92-kD type collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 124: 1091-1102.
- Revillion, F., Vandewalle, B., Hornez, L. y Lefebvre, J.** (1993). Influence of cAMP on E-cadherin expression and cell surface heparan sulfate proteoglycan synthesis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 13: 1625-1630.
- Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J. y Zhang, Z.** (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120^{cas} associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14: 8333-8342.
- Riethmacher, D., Brinkmann, V. y Birchmeier, C.** (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 855-859.
- Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. y Morrow, J. S.** (1995). Alpha1(E)-catenin is an actin-binding and bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8813-8817.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dölz, R., Jähnig, F., Epplen, J., Mayer, S., Müller, C. y Kemler, R.** (1987). The structure of the cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanisms of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *EMBO J* 6: 3647-3653.
- Ringwald, M., Baribault, H., Schmidt, C. y Kemler, R.** (1991). The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Nucleic Acids Res* 19: 6533-6539.
- Risinger, J. I., Berchuck, A., Kohler, M. F. y Boyd, J.** (1994). Mutations of the E-cadherin gene in human gynecological cancers. *Nat Genet* 7: 98-102.
- Rodgers, W. H., Matrisian, L. M., Giudice, L. L., Dsurpin, B., Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F. y Osteen, K. G.** (1994). Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 94: 946-953.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamnerlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S. y Polakis, P.** (1993). Association of the APC gene product with β -catenin. *Science* 262: 1731-1734.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fioi, C., Munemitsu, S. y Polakis, P.** (1996). Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272: 1023-1026.

- Ruggeri, B., Caamano, J., Slaga, T. J., Conti, C. J., Nelson, W. J. y Klein-Szanto, A. J. (1992). Alterations in the expression of uvomorulin and Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase during mouse skin tumor progression. *Am J Pathol* 140: 1179-1185.
- Ryan, K. M. y Birnie, G. D. (1996). *Myc* oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* 314: 713-721.
- Ryden, T. A. y Beemon, K. (1989). Avian retrovirus long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol Cell Biol* 9: 1155-1164.
- Saffer, J. D., Jackson, S. P. y Annarella, M. B. (1991). Developmental expression of Spl in the mouse. *Mol Cell Biol* 11: 2189-2199.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Prieto, R., Quintanilla, M., Cano, A., Leonart, M. L., Martín, P., Anaya, A. y Ramón y Cajal, S. (1996). Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* 13: 1083-1092.
- Sano, K., Takihara, H., Heimark, R. L., Obata, S., Davidson, M., St Johns, T., Taketani, S. y Suzuki, S. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J* 12: 2249-2256.
- Sato, S., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, J. y Seiki, M. (1992). Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various tumor cells. *Oncogene* 7: 77-83.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. y Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370: 61-65.
- Savagner, P., Yamada, K. y Thiery, J. P. (1997). The zinc-finger protein Slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137: 1403-1419.
- Scheider, S. (1992). The human protooncogen ret: a communicative cadherin? *TIBS* 17: 468-469.
- Schipper, J. H., Frixen, U. H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K. y Birchmeier, W. (1991). E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res*: 6328-6337.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hoffer, H., Janicke, F. y Graeff, H. (1997). Clinical impact of the plasminogen activator system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 78: 285-296.
- Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R. y Mitchell, P. J. (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381: 235-238.
- Schuh, R., Vestweber, D., Riede, I., Ringwald, M., Eosenberg, U. B., Jackle, H. y Kemler, R. (1986). Molecular cloning of the mouse cell adhesion molecule uvomorulin: cDNA contains B1-related segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1364-1368.
- Sekido, R., Murai, K., Funahashi, J., Kamachi, Y., Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y. y Kondoh, H. (1994). The δ -crystallin enhancer-binding protein δ EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 14: 5692-5700.
- Shapiro, D. J., Sharp, P. A., Wahli, W. W. y Keller, M. J. (1988). A high-efficiency cell nuclear transcription extract. *DNA* 7: 47-55.

- Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Gröbel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R. y Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374: 327-337.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M. e Ito, F. (1994). Tyrosine phosphorylation of β -catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1: 295-305.
- Shimamura, K. y Takeichi, M. (1992). Local and transient expression of E-cadherin involved in mouse embryonic brain development. *Development* 116: 1011-1019.
- Shimamura, K., Hirano, S., McMahon, A. P. y Takeichi, M. (1994). Wnt-1-dependent regulation of local E-cadherin and α N-catenin expression in the embryonic mouse brain. *Development* 120: 2225-2234.
- Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M. y Abe, O. (1989). Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 49:2128-2133.
- Shimoyama, Y. e Hirohashi, S. (1991a). Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 57: 131-135.
- Shimoyama, Y. e Hirohashi, S. (1991b). Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 51: 2185-2192.
- Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., Fujita, S., Gotoh, M., Takeichi, M., Tsukita, S. e Hirohashi, S. (1992). Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of α -catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res* 52: 5770-5774.
- Shirayoshi, Y., Hatta, K., Hosoda, M., Tsunasawa, S., Sakiyama, F. y Takeichi, M. (1986a). Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share common structure. *EMBO J* 5: 2485-2488.
- Shirayoshi, Y., Nose, A., Iwasaki, K. y Takeichi, M. (1986b). N-linked oligosaccharides are not involved in the function of a cell-cell binding glycoprotein E-cadherin. *Cell Str Funct* 11: 245-252.
- Sommers, C. L., Gelmann, E. P., Kemler, R., Cowin, P. y Byers, S. W. (1994). Alterations in β -catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 54: 3544-3552.
- Sorkin, B. C., Hemperley, J. J., Edelman, G. M. y Cunningham, B. A. (1988). Structure of the gene for the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7617-7621.
- Sorkin, B. C., Jones, F. S., Cunningham, B. A. y Edelman, G. M. (1993). Identification of the promoter and a transcriptional enhancer of the gene encoding L-CAM, a calcium-dependent cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11356-11360.
- Sorscher, S. M., Green, M. R. y Feramisco, J. R. (1995). Enhanced E-cadherin expression in epidermal growth factor receptor expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 518-524.
- Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S. y Liotta, L. A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541-573.
- Stöger, R., Kubicka, P., Liu, C. G., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H. y Barlow, D. P. (1993). Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 73: 61-71.
- Stoler, A. B., Stenback, F. y Balmain, A. (1993). The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *J Cell Biol* 122: 1103-1117.

- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. y Goldberg, G. L.** (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 270: 5331-5338.
- Su, L. K., Vogelstein, B. y Kinzler, K. W.** (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262: 1734-1737.
- Sugimoto, K., Honda, S., Yamamoto, T., Ueki, T., Monden, M., Kaji, A., Matsumoto, K. y Nakamura, T.** (1996). Molecular cloning and characterization of a newly identified member of the cadherin family, PB-cadherin. *J Biol Chem.* 271:11548-11556.
- Suzuki, S. T.** (1996). Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci* 109: 2609-2611.
- Takeichi, M.** (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface molecules. *J Cell Biol* 75: 464-474.
- Takeichi, M.** (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102: 639-655.
- Takeichi, M.** (1991). Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulators. *Science* 251: 1451-1455.
- Takeichi, M.** (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Op Cell Biol* 5: 806-811.
- Takeichi, M.** (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Op Cell Biol* 7: 619-627.
- Tanaka, H., Hojo, K., Yoshida, H., Yoshioka, T. y Sugita, K.** (1993). Molecular cloning and expression of the mouse 105-kDa gelatinase cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 732-740.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M. y Hayashi, S.** (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot. *Development* 122: 3697-3705.
- Tannapfel, A., Yasui, W., Yohozaki, H., Wittekind, C. y Tahara, E.** (1994). Effect of hepatocyte growth factor on the expression of E- and P-cadherin in gastric carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 425: 139-144.
- Tashiro, K., Tooi, O., Nakamura, H., Koga, C., Ito, Y., Hikasa, H. y Shiokawa, K.** (1995). Cloning and expression studies of cDNA for a novel *Xenopus* cadherin (XmN-cadherin), expressed maternally and later neural-specifically in embryogenesis. *Mech Dev* 54: 161-171.
- Taylor, D. A., Kraus, V. B., Schwarz, J. J., Olson, E. N. y Kraus, W. E.** (1993). E1A-mediated inhibition of myogenesis correlates with a direct physical interaction of E1A12S and basic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 13: 4714-4727.
- Tennenbaum, T., Yuspa, S. H., Grover, A., Castronovo, H., Sobel, M. E., Yamada, Y. y De Luca, L. M.** (1992). Extracellular matrix receptors and mouse skin carcinogenesis: altered expression linked to appearance of early markers of tumor progression. *Cancer Res* 52: 2966-2976.
- Tennenbaum, T., Weinreb, A. K., Belanger, A. J., Glick, A. B., Hennings, H y Yuspa, S. H.** (1993). The suprabasal expression of $\alpha 6 \beta 4$ integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 53: 4803-4810.
- Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Török, T. y Hartenstein, V.** (1996). Shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neuroectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* 10: 672-685.

- Thomson, R. B., Igarashi, P., Biemesderfer, D., Kim, R., Abu-Alfa, A., Soleimani, M. y Aronson, P.S. (1995). Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J Biol Chem* 270: 17594-17601.
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. y Grosschedl, R. (1991). LEF-1, a gene encoding lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor α enhancer function. *Genes Dev* 5: 880-894.
- Trimble, M. S., Xin, J.-H., Guy, C. T., Muller, W. J. y Hasell, J. A. (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 8: 3037-3042.
- Troyanovsky, S. M., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Krutovskikh, V. A., Leube, R. E. y Franke, W. W. (1994). Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. *J Cell Biol* 127: 151-160.
- Tseng, H. y Green, H. (1994). Association of basoon with the ability of keratinocytes to multiply and with the absence of terminal differentiation. *J Cell Biol* 126: 495-506.
- Tsukita, Sh., Tsukita, S., Nagafuchi, A. y Yonemura, S. (1992). Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 4: 834-839.
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y. y Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 10: 659-671.
- Umbas, R., Schalken, J. A., Aalders, T. W., Carter, B. S., Karthaus, H. F., Schaafsma, H. E., Debruyne, F. M. J. y Isaacs, W. B. (1992). Expression of the cell adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 52: 5104-5109.
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O. N., Debruyne, F. M. J. y Schalken, J. A. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostatic cancer. *Cancer Res* 54: 3929-3933.
- Vestal, D. y Ranscht, B. (1992). Glycosyl phosphatidylinositol-anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *J Cell Biol* 119: 451-461.
- Vleminckx, K., Vakaet, L. J., Mareel, M., Fiers, W. y Van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 107-119.
- Wang, X., Fu, X., Brown, P. D., Crimmin, M. J. y Hoffman, R. M. (1994). Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (Batimastat) inhibits human colonic tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 54: 4726-4728.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., LePrince, D. y Stehelin, D. (1990). The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346: 191-193.
- Wasylyk, C., Kerckaert, J. P. y Wasylyk, B. (1992). A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev* 6: 965-974.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L. y Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211: 7-18.
- Watabe, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S. y Takeichi, M. (1994). Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma cell line. *J Cell Biol* 127: 247-256.
- Watson, S. A., Morris, T. M., Robinson, G., Crimmin, M. J., Brown, P. D. y Hardcastle, J. D. (1995). Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastatic models. *Cancer Res* 55: 3629-3633.

- Watt, F. M. y Hertle, M. D.** (1994). Keratinocyte integrins. En *The keratinocyte handbook*. (Leigh, I. M., Lane, E. B., Watt, F. M., eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 153-164.
- Welch, D. R., Fabra, A. y Nakajima, M.** (1990). Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7678-7682.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M-B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandenbunder, B. y Stehelin, D.** (1994). Stromal expression of c-ets 1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 54: 5683-5688.
- Wheelock, M. J. y Jensen, P. J.** (1992). Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *J Cell Biol* 117: 415-425.
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. y Goldberg, G. I.** (1989). SV-40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264: 17213-17221.
- Williams, T. y Tjian, R.** (1991). Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 251: 1067-1071.
- Wilson, C. L., Heppner, K. J., Rudolph, L. A. y Matrisian, L. M.** (1995). The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. *Mol Biol Cell* 10: 851-869.
- Witty, J. P., McDonnell, S., Newell, K. J., Cannon, P., Navre, M., Tressler, R. J. y Matrisian, L. M.** (1994). Modulation of matrilysin level in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity *in vivo*. *Cancer Res* 54: 4805-4812.
- Wu, H., Moulton, K., Horval, A., Parik, S. y Glass, C.** (1994). Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol Cell Biol* 14: 2129-2139.
- Xin, J-H., Cowie, A., Lachance, P. y Hassell, J. A.** (1992). Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the *Ets* oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev* 6: 481-496.
- Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. y Shimizu, S.** (1988). Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 158-162.
- Yoshida, C. y Takeichi, M.** (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell surface protein involved in calcium-dependent cell-cell aggregation. *Cell* 28: 217-224.
- Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T. e Hirohashi, S.** (1995). Silencing of the E-cadherin invasion suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7416-7419.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelmam, D. y Moon, R.T.** (1996). The axis-inducing activity, stability and subcellular distribution of β -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10: 1443-1454.
- Yukawa, K., Yasui, T., Yamoto, A., Shiku, H., Kishimoto, T. y Kikutani, H.** (1993). Epoc-1: a POU-domain gene expressed in murine epidermal basal cell and thymic stromal cells. *Gene* 133: 163-169.
- Yurchenko, P. D. y O'Rear, J.** (1994). Basal lamina assembly. *Curr Op Cell Biol* 6: 674-681.
- Yuspa, S. H.** (1994). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis- Thirty-third G. H. A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 54: 1178-1189.

Zhang, J., Hagopian-Donladson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A. P., Flavell, R. A. y Williams, T. (1996). Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381: 238-241.

Zhu, A. y Watt, F. (1996). Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 109: 3013-3023.

Zschiesche, W., Schonborn, I., Behrens, J., Herrenknecht, K., Hartveit, F., Lilleng, P. y Birchmeier, W. (1997). Expression of E-cadherin and catenins in invasive mammary carcinomas. *Anticancer Res* 17: 561-567.

ANEXO

Analysis of the E-Cadherin and P-Cadherin Promoters in Murine Keratinocyte Cell Lines From Different Stages of Mouse Skin Carcinogenesis

María Luisa M. Faraldo¹, Isabel Rodrigo,¹ Jürgen Behrens,² Walter Birchmeier,² and Amparo Cano^{1*}

¹*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain*

²*Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, Germany*

We previously isolated the 5' upstream sequences of the mouse P-cadherin gene, in which putative binding sites for several transcription factors were identified between nt –101 and +30. In the study reported here, the promoter activity of the postulated 5' cis-acting sequences of the P-cadherin promoter, and the activity of the proximal E-cadherin promoter were investigated in several murine keratinocyte cell lines showing different levels of P- and E-cadherin expression as well as different morphology and tumorigenic behavior. Cell-type specificity and optimal activity of P-cadherin expression in murine keratinocytes was conferred by 5' sequences located between nt –200 and +30, and the GC-rich region (nt –101 to +80) and a CCAAT box element (nt –65) had a major regulatory role. The cell-type specificity of the E-cadherin promoter, on the other hand, was mediated by a combination of positive regulatory elements, a GC-rich region (nt –58 to –24), and a CCAAT box (nt –65) and repressor elements inside the E-pal sequence. Interestingly, the maximum repressor effect of the E-pal element was observed in non-expressing undifferentiated spindle cells. In vitro binding studies indicated that the GC-rich region of the P-cadherin promoter was mainly recognized by Sp1-related nuclear factors, whereas both AP2- and Sp1-related factors were involved in the interaction of the GC-rich region of the E-cadherin promoter. Common factors (probably related to the CP1 family) seemed also to be involved in the recognition of the CCAAT-box element of both the E- and P-cadherin promoters, but additional specific factors participated in the interaction with the CCAAT box of the E-cadherin promoter. Our studies also support the hypothesis that loss or modification of some of the regulatory factors occurs during mouse skin tumor progression. *Mol. Carcinog.* 20:33–47, 1997. © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Key words: cadherin expression; tumor progression; nuclear factors; regulatory elements

INTRODUCTION

Cadherins are major calcium-dependent cell-cell adhesion molecules whose involvement in morphogenetic and pathological processes has been extensively studied in the last decade [reviewed in 1,2]. It is presently assumed that cadherins constitute a gene superfamily in which four of the best characterized members, presently called "classical" cadherins [3], were first identified by their specific tissue distribution: E-cadherin (epithelial) [4–6], P-cadherin (placental) [7], N-cadherin (neural) [8], and liver cell adhesion molecule (L-CAM) (chicken liver) [9]. Although P-cadherin has the highest homology to E-cadherin (58% amino acid identity), both molecules exhibit a specific tissue distribution, with P-cadherin being highly expressed in some epithelial as well as non-epithelial tissues [10]. The differential expression of E- and P-cadherin is maintained even in some epithelia in which the two cadherins coexist: for instance, in the epidermis, E-cadherin is expressed in all living cells, including basal, spinous, and granular cells, whereas P-cadherin is restricted to the basal cell layer of the epidermis [7,11].

During embryonic development, cadherin expression occurs very early, and a specific spatio-temporal program for the different members must be completed for correct morphogenesis of the embryo [1,10]. In the adult organism, the specific expression of cadherins plays also an important role in the maintenance of tissue architecture. Interestingly, misexpression of cadherins occurs during the tumorigenic processes and may in part explain the disruption of cell-cell association that frequently takes place in tumor cells. Specifically, downregulation of E-cadherin has been reported in a high variety of

The current address of María Luisa M. Faraldo is Unité Mixte de Recherche 144 CNRS-Institut Curie (Section Recherche), 26 rue d'Ulm, 75231 Paris, Cedex 05, France.

María Luisa M. Faraldo and Isabel Rodrigo contributed equally to this work.

*Correspondence to: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain.

Received 2 December 1996; Revised 28 April 1997; Accepted 14 May 1997

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyltransferase; L-CAM, liver cell adhesion molecule; SV40, simian virus 40.

human epithelial tumors and in animal models [reviewed in 2,12], and an anti-invasive role has been proposed for this molecule. In general, expression of E-cadherin in carcinomas is strongly correlated with the differentiation grade of the tumors [2]. In contrast, P-cadherin expression, although initially associated with the maintenance of the proliferative compartment in some tumors and normal epithelia [13,14], has also been related to the segregation of basal cell layers and the arrangement of epidermal cells in some skin appendages during embryonic development [11]. Our previous studies and those of other groups on E- and P-cadherin expression in mouse skin carcinogenesis indicated differential alterations in both molecules with tumor progression: downregulation of E-cadherin occurs in squamous cell carcinomas and in progressing papillomas, whereas increased expression of P-cadherin is observed in papillomas and squamous cell carcinomas, and both molecules are completely suppressed in fully undifferentiated spindle cell carcinomas [15–17].

To understand the regulation of cadherin expression during normal development and neoplasia, it is important to study the regulatory elements that control cadherin gene expression. The genomic organizations of E- [18], P- [19], and N-cadherin [20] and of L-CAM [21] were previously reported. Analyses of the E-cadherin promoter and regulatory elements have attracted great interest in recent years and have led to the identification of positive (GC-rich region and CCAAT box) and negative (E-pal) elements in the 5' proximal sequences (nt -94 to +1) [22–25] and an epithelial enhancer in the first intron [25]. With the exception of L-CAM [26,27], much less is known about the regulation of the cadherin genes and in particular about the P-cadherin promoter. A previous study analyzed the role of distal 5' sequences and of two large regions of the second intron of the P-cadherin gene in the transcriptional activity, without showing any apparent cell-type specificity [28]. We previously cloned about 1 kb of the 5' sequence of the mouse P-cadherin gene and characterized the transcription start site and the first, small intron [29]. Sequence analysis showed that the 5' proximal P-cadherin promoter region has some similarities to the mouse E-cadherin promoter, such as the absence of a TATA box and the presence of a CCAAT box (nt -65) and a GC-rich region (nt -101 to -80) containing potential binding sites for Sp1 and AP2 transcription factors, but they differ in the absence of a palindromic element (E-pal) in the P-cadherin promoter [29].

In the study reported here, we analyzed the involvement of the previously postulated 5' proximal cis elements on the activity of the mouse P-cadherin promoter and the activity of the proximal E-cadherin promoter in several mouse skin carcinogenesis keratinocyte cell lines that exhibit different P- and E-cadherin expression levels, phenotypic behavior, and

degrees of tumorigenicity [15]. The results indicated that the 5' GC-rich sequences (which are recognized by Sp1-related factors) and the CCAAT regions of the P-cadherin promoter were involved in cell-type specificity and optimal activity. A more complex pattern of regulation existed in the E-cadherin promoter, involving positive regulatory elements (5' GC-rich and CCAAT regions) and repressor elements (E-pal), the latter mainly acting in non-expression undifferentiated spindle carcinoma cells. Comparison of the GC-rich and CCAAT regions of the E- and P-cadherin promoters in murine keratinocytes also revealed the existence of common regulatory factors (Sp1 and CP1 related) in both promoters, of additional specific factors for the recognition of the E-cadherin promoter, and of involvement of AP2-related factors in the GC-rich region. Modification of some of the factors or alterations in their interaction with coactivators seemed to be involved in the downregulation of E- and P-cadherin expression in carcinoma-derived keratinocyte cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The origins of the mouse epidermal keratinocyte lines used here (MCA3D, PDV, HaCa4, and CarB) were previously described [15,30] (Table 1). The cells were routinely grown in Ham's F-12 medium supplemented with amino acids and 10% (v:v) fetal calf serum (GIBCO Ltd., Paisley, Scotland) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For the transient transfection assays, this medium was replaced with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Ltd.) also supplemented with 10% fetal calf serum.

Plasmid Constructions

To obtain the different P-cadherin promoter constructs, appropriate fragments to be inserted into reporter plasmids were obtained from the plasmid pP5, a genomic clone containing P-cadherin nt -1060 to +3300 [29], after subcloning of the -1060/+285 SacI-SphI fragment and digestion with exonuclease III, which gave a common 3' end to most of the fragments (nt +47), except for the Δ AP2 construct (see below). Digestion with suitable restriction enzymes made the 5' ends of the different fragments at nt -200, -75, and -25. The fragments were inserted into the promoterless reporter plasmid pXP1 [31] upstream the luciferase gene. The Δ AP2 construct was obtained from the -200 construct by digestion with exonuclease III of nt +14 to +47 of the promoter. These different constructs are shown schematically in Figure 1A. The different E-cadherin promoter constructs, which contained several deletion fragments, the mutated E-pal sequence, or two independent subregions of the GC-rich region (GCI and GCII) of the E-cadherin promoter, were derived from the deletion construct -178/+92 cloned into the vector

Table 1. Characteristics of Epidermal Keratinocyte Cell Lines Used

Cell line	Origin	Morphology*	Expression [†]		Tumorigenicity [‡]
			E-cadherin	P-cadherin	
MCA3D	Primary epidermal culture treated with DMBA	E	+++	++	—
PDV	Primary epidermal culture treated with DMBA	E	++	+++	+
HaCa4	Derived from a squamous cell carcinoma	Ed	—	++	++
CarB	Derived from a spindle cell carcinoma	F	—	—	++

*E, epithelial; Ed, epithelioid; F, fibroblastoid.

[†]Relative levels estimated by northern blot analysis [15].

[‡]Tumorigenic behavior was analyzed by injection into nu/nu mice and estimated from the number of tumors and latency periods [15,30].

pCAT basic and were previously described in detail [22,25]. The E-pal sequence was mutated to CACCTTTAGGTG and the GCI and GCII subregions were mutated to GCCGTTTTC and TTCTGCGGG, respectively [25]. The construct containing a deleted E-pal sequence (Δ -Epal) was obtained from the deletion construct -178/+92 by removal of the nt -99 to -79 PstI fragment, blunt ended with T4 DNA polymerase, and religated. The various E-cadherin promoter constructs used are schematically represented in Figure 2A and Table 2. The hybrid GC.E/-75 promoter was obtained by introduction of a double-stranded oligonucleotide containing the complete GC-rich region from the E-cadherin promoter (nt -60 to -23) into the -75 construct of the P-cadherin promoter by using the 5' BamHI restriction site. The hybrid E-pal/-200 construct was obtained by insertion of a double-stranded oligonucleotide containing the E-pal sequence from the E-cadherin promoter (nt -92 to -69) in the XhoI restriction site located upstream of the -200 construct of the P-cadherin promoter.

Transient Transfection Assays

The Ham's F-12 medium, in which cells were growing at about 25% confluence, was replaced with Dulbecco's modified Eagle's medium 4–6 h before transfection. Cells in 6-cm cell-culture dishes were transfected by the calcium phosphate precipitation method with 5 μ g of the different luciferase or chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter constructs. In the P-cadherin promoter analysis, transfection efficiency was monitored by cotransfection with 4 μ g of the plasmid pCH110 (Promega Corp., Madison, WI), which contains the *Escherichia coli lacZ* gene under the control of the simian virus 40 (SV40) promoter or the plasmid RSV-CAT [32], which contains the reporter gene for CAT under the control of the Rous sarcoma virus promoter. For the E-cadherin promoter analysis, transfection efficiency was monitored by cotransfection with 2.5 μ g of CMV-Luc plasmid which contains the reporter luciferase gene under the control of the cytomegalovirus promoter [33]. Sixteen hours after the addition of the

precipitate, the cells were washed with phosphate-buffered saline, and the medium was replaced with fresh Ham's F-12. After an additional 24 h, the cells were harvested and resuspended in 0.25M Tris HCl, pH 7.5, and cell extracts were obtained by three consecutive freeze-and-thaw cycles. For P-cadherin promoter transfections, β -galactosidase activity (in 50 μ L of cell extracts) or CAT activity (in aliquots containing 20 μ g of protein) were first determined as described previously [34,35], and cell-extract aliquots with equivalent β -galactosidase or CAT activities were then assayed for luciferase activity with a kit (Promega Corp.). The activities driven by the different P-cadherin promoter constructs were compared with that produced by the CMV-Luc reporter plasmid in the different cell lines and expressed as the percentage of CMV-Luc activity. The basal activity of the promoterless pXP1 plasmid was also determined. For E-cadherin promoter transfections, the luciferase activity of cell extracts were first analyzed as described above, and aliquots containing equivalent luciferase activity were then analyzed for CAT activity as described previously [35]. The activities driven by the different E-cadherin promoter constructs were compared with that produced by the pCAT-control vector, which contains the CAT gene under the control of the SV40 promoter, in the different cell lines and expressed as the percentage of SV40-CAT activity. The basal activity of the promoterless pCAT-basic vector (Promega Corp.) was also determined and subtracted.

Gel Retardation and In Vitro Footprinting Assays

Nuclear extracts were prepared from the different keratinocyte cell lines as previously reported for HeLa cells [36]. Gel retardation assays were performed basically as previously described [37], with some modifications in the DNA-protein incubation buffer (which was 20 mM HEPES, pH 7.9; 60 mM KCl; 10% glycerol; 0.1 mM EDTA; 2 mM $MgCl_2$; and 1 mM dithiothreitol). As a nonspecific competitor, 1 μ g of poly(dI-dC) (Boehringer Mannheim S.A., Barcelona, Spain) was used. For supershift analysis, anti-Sp1 and

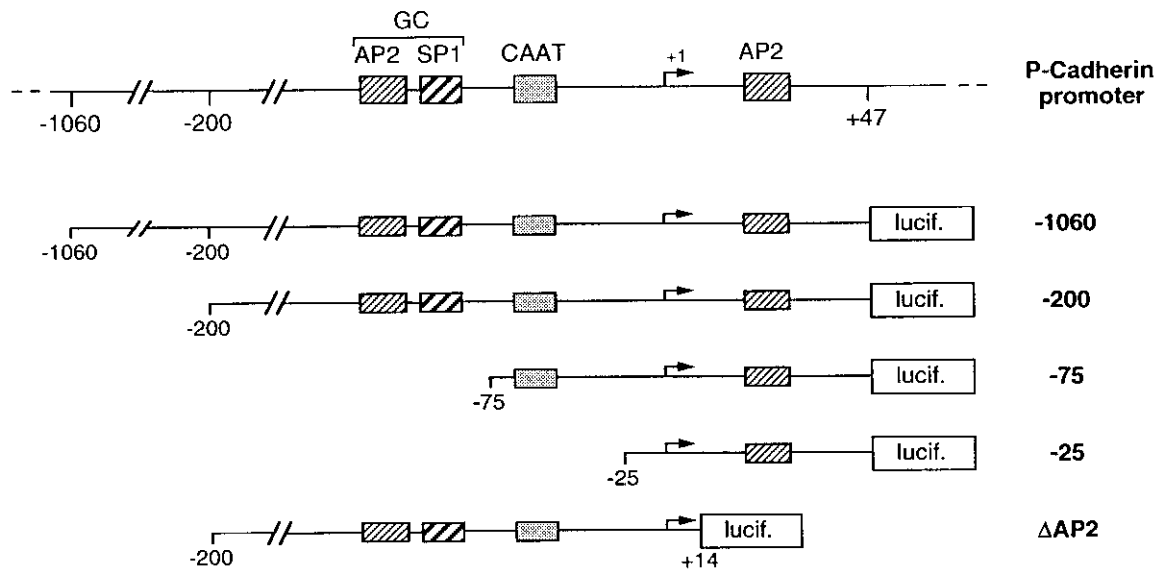
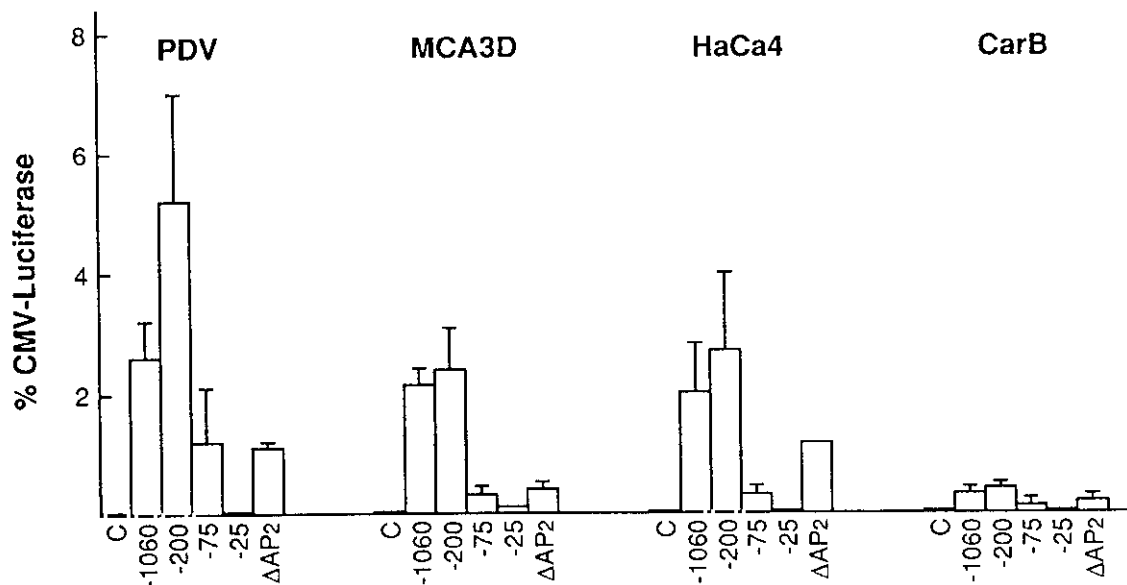
A**B**

Figure 1. (A) Schematic representation of the different constructs obtained with deletion fragments of the P-cadherin 5' upstream region (-1060, -200, -75, -25, and ΔAP2) fused to a luciferase reporter gene in the pXP1 promoterless vector as described in Materials and Methods. Shown are potential binding sites for the transcription factors Sp1 (▨), and AP2 (▩) and the CCAAT box (▧). The arrow shows the transcription initiation site. (B) Promoter activity of the different constructs of the P-cadherin promoter in the indicated keratinocyte cell

lines. The luciferase activity of the different deletion constructs was normalized to β-galactosidase or CAT activity in the same extract and is represented as the percentage of the activity driven by the cytomegalovirus promoter (CMV-Luc) in each cell line. The various P-cadherin deletion constructs are indicated below the bars; luciferase activity driven by plasmid pXP1 (C) is also represented. The results shown are average values from three to 10 independent experiments performed in duplicate. The error bars indicate standard deviations.

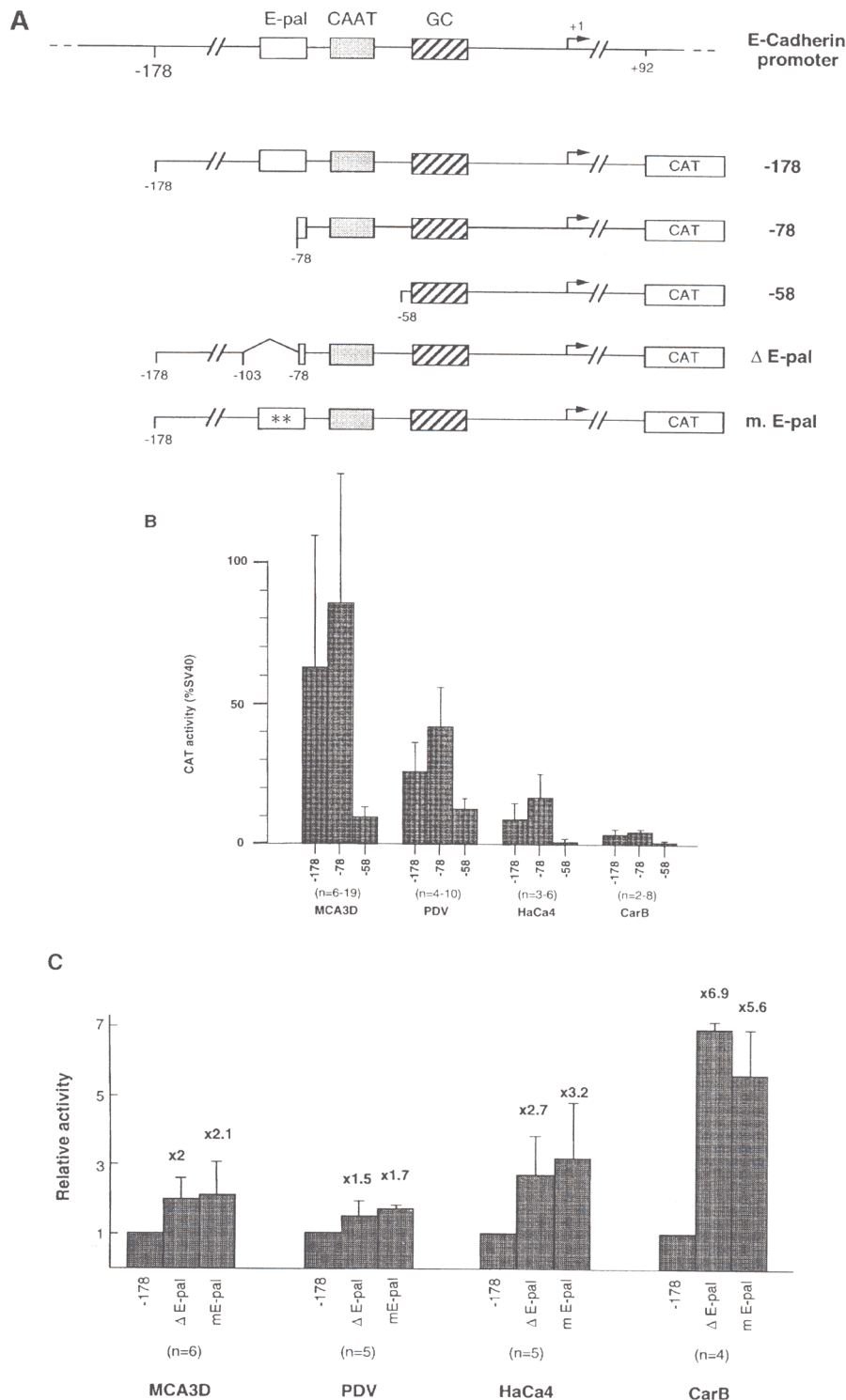


Figure 2. (A) Schematic representation of the different constructs obtained with deletion fragments of the E-cadherin 5' upstream region (-178, -78, -58, ΔE-pal, mE-pal) fused to a CAT reporter gene in the pCAT basic promoterless vector as described in Materials and Methods. Shown are transcription-factor binding sites E-pal (□), the GC-rich region (▨) and the CCAAT box (■). The arrow shows the transcription initiation site. (B) Promoter activity of the different constructs of the E-cadherin promoter in the indicated keratinocyte cell lines. The CAT activity of each deletion construct was normalized to luciferase activity in the same extract and is represented as the percentage of the activity driven by the SV40 promoter (pCAT control vector) in each cell line. The various

E-cadherin deletion constructs are indicated below the bars, as is the number of independent experiments (n) performed in duplicate. The results shown are the average values, and the error bars show the standard deviations. (C) Promoter activity of the E-cadherin constructs containing mutated or deleted E-pal elements in the different cell lines. The CAT activities were measured as described in panel B and normalized to the relative activity of the -178 construct in each cell line. The number of independent experiments (n) performed in duplicate is indicated. The values are averages and the error bars indicate the standard deviations. The fold-increase in promoter activity obtained in each case is indicated by the numbers on the top of the error bars.

Table 2. Effects of Mutations in the CG-Rich Region on E-cadherin Promoter Activity

Promoter constructs [†]	Relative activity (\pm SD)*	
	MCA3D (n=3)	HaCa4 (n=4)
Wild type (-178) GCCGGGGGCGGTGCCTGCGGGC	1	1
Mutant GCI GCCGTTTTCGGTGCCTGCGGGC	0.4 (0.14)	0.44 (0.07)
Mutant GCII GCCGGGGGCGGTTTCTGCGGGC	0.52 (0.04)	0.63 (0.11)

*The activity of the E-cadherin promoter, estimated as described in Figure 2, is expressed relative to the -178 construct in each cell line. n, number of independent experiments performed in duplicate.

[†]Constructs containing nt -178 to +92 of the E-cadherin promoter were analyzed. The sequence of the GC-rich region (nt -53 to -32) of the wild-type and GCI and GCII mutants is indicated.

anti-AP2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or control rabbit IgG (1 μ g) were added to the reaction mixtures and incubated for 25 min at room temperature. The following oligonucleotides, which correspond to different elements of the E- and P-cadherin promoters [22,29] and their complements were used: CCAAT.P (GTTGGACCAATCAGCAGC), CCAAT.E (CGTCCCCAGCCAATCAGC), GC.P (TCGACCCACCTGCGAGGGGGCGGGACC), GC.E (CAGCGGCGCCGGGGGCGGTGCCTGCGG-GCTCACCTGGC), E-pal (GGCTGCCACCTGCA-GGTGCGTCCC), SP1.P (CGAGGGGGCGGGAC-CTTG), and AP2.P (GCCTCGACCCACCTGCG).

The oligonucleotides containing the consensus binding sequences of different transcription factors used as competitors were Sp1.SV40 [38], AP2.SV40 [39], CP1 and CP2 [40], C/EBP [41], and NF1 [42]. All oligonucleotides used contained BamHI overhangs at their 5' and 3' ends (GATCC and G, respectively). Complementary oligonucleotides were hybridized, and the double-stranded products were end labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase [34].

For DNase I footprinting analysis of the P-cadherin promoter, the nt -200 to +120 KpnI-KpnI fragment was labeled at the 3' end of the noncoding or coding strand with Klenow fragment. For DNase I footprinting analysis of the E-cadherin promoter, an XbaI-KspI fragment containing nt -178 to +17 was labeled at the 3' end of the noncoding strand with Klenow fragment. Footprinting reactions were performed as described previously [37] by using 10–50 μ g of nuclear extracts, 1 μ g of poly(dI-dC), and 1–2 ng (about 15 000 cpm) of labeled probe per reaction. Sp1 footprinting assays were performed with recombinant purified human transcription factors (Promega Corp.) (1 foot printing unit (fpu)), and no poly(dI-dC) was added.

RESULTS

Promoter Activity of the 5' Flanking Regions of the Mouse P-cadherin and E-cadherin Genes in Mouse Keratinocyte

Our previous study of 5' sequences of the mouse P-cadherin gene revealed several putative binding sites for transcription factors in the proximal region: a GC-rich region (nt -101 to -80) containing potential binding sites for Sp1 (nt -85) and AP2 (nt -95), a CCAAT box (nt -65), and an additional AP2 binding site downstream of the initiation site (nt +30) [29]. Comparison with the 5' sequence of the mouse E-cadherin gene showed that similar regulatory sequences were present in the mouse E-cadherin promoter region: a CCAAT box (nt -65) and a GC-rich region (nt -58 to -25) with binding sites for AP2 and Sp1 factors. However, the 5' sequences differed in that the E-cadherin gene has a palindromic E-pal element (nt -86 to -75) [22].

To investigate the involvement of the postulated 5' regulatory elements in the activity of both cadherin promoters in normal and malignant keratinocytes, transient transfection assays were performed with four selected murine keratinocyte cell lines previously characterized for their expression of E- and P-cadherin [15]. As summarized in Table 1, the cell lines also varied in their tumorigenic behavior and morphological phenotypes. The P-cadherin levels ranged from nil in undifferentiated CarB cells to the highest level in epithelial PDV cells (PDV > HaCa4 \geq MCA3D; CarB, negative). Regarding E-cadherin expression, two of the cell lines were positive (MCA3D > PDV), and the other two (HaCa4 and CarB) were negative. To analyze the activity of the P-cadherin promoter, deletion fragments of the 5' region containing the different putative regulatory elements were fused to a luciferase reporter gene (Figure 1A) and tested in transfection assays with the selected cell lines. As can be observed in Figure 1B, the longest construct, -1060, exhibited similar activity in the three P-cadherin-expressing cell lines (PDV, MCA3D, and HaCa4) and very low activity in non-expressing CarB cells (about 10% of that of PDV cells). The -200 construct, which contained the putative binding sites for Sp1 and AP2 (GC-rich region), AP2 (nt +30), and CCAAT binding proteins, showed the highest activity in all cell lines tested. The activity of the -200 construct closely resembled the level of P-cadherin mRNA expression in the four keratinocyte cell lines, being stronger in PDV cells than in HaCa4 and MCA3D cells and very weak in CarB cells (about 12-fold lower than in PDV).

Deletion of nt -200 to -76 which contains the 5' AP2 and Sp1 putative binding sites (construct -75) led to a strong decrease in the promoter activity in all the cell lines (to 11–22% of that of the -200 construct). The promoter activity further dropped to nearly the level of the pXP1 promoterless control

vector when the region containing a CCAAT-box sequence was deleted (–25 construct). When the second putative AP2 binding site, located at nt +30, and its flanking sequences were removed from the –200 fragment (Δ AP2 construct), a decrease of variable intensity (to 40–80% of that of the –200 construct) was observed in the different cell lines (Figure 1B).

The activities of the –1060 and –200 constructs were also tested in three additional P-cadherin-negative cell lines: NIH3T3 fibroblasts, which are negative for P-cadherin expression [28], and two independent spindle carcinoma cell lines, MSC11A5 and MSC11D3 [43], which express very low levels of P-cadherin mRNA (about 5% of that of PDV cells). The –200 construct exhibited a low promoter activity (0.3–0.8% of that of CMV-luc activity) in the three cell lines, and the relative activity of the –1060 construct was similar to that observed in CarB cells (data not shown).

These results indicated that elements conferring cell-type specificity and optimal activity for P-cadherin expression in cultured keratinocytes appeared to be within nt –200 to +30 of the mouse P-cadherin gene and suggested that the GC-rich region and the CCAAT box can play a regulatory role.

The activity of the E-cadherin promoter in the keratinocyte cell system was also analyzed by transient transfection assays using several constructs containing different elements of nt –178 to +92 of the mouse E-cadherin gene coupled to a CAT reporter gene (Figure 2A) [22,25]. As shown in Figure 2B, the 5' cis elements present in the –178 construct of the E-cadherin promoter exhibited cell-type specificity, as this construct was active in expressing cells, with the highest activity detected in MCA3D, less activity in PDV, and almost no activity in non-expressing CarB cells. In contrast, the –178 promoter construct had moderate activity in non-expressing HaCa4 cells. Similar results were obtained when a longer fragment up to nt –1400 of the E-cadherin gene was used (data not shown). Deletion of distal 5' sequences containing the E-pal element (–78 construct) gave rise to a significant increase in the promoter activity in all tested keratinocyte cell lines, whereas additional deletion of the CCAAT box (–58 construct) partly (MCA3D and PDV) or completely inhibited (HaCa4) the promoter activity. To analyze the role of the E-pal element, two additional constructs in which the central two nucleotides of the E-pal sequence were either mutated (m-E-pal) or deleted (Δ E-pal) from the –178 construct were used (Figure 2A). The mutated E-pal element induced a moderate to strong increase in the activity of the E-cadherin promoter in the four cell lines, with a higher effect observed in the non-expressing HaCa4 cells (about a threefold increase) and more significantly in spindle CarB cells (sixfold to sevenfold increase) (Figure 2C). The role of the GC-rich region was also analyzed by using two additional constructs in which two subregions

(GCI and GCII) containing potential binding sites for AP2 and Sp1 factors were mutated [25]. As shown in Table 2, mutation of both regions decreased the E-cadherin promoter activity 60% and 40–50% for GCI and GCII mutants, respectively, both in MCA3D and HaCa4 cells, as previously reported in other cell types [22,25]. On the other hand, the promoter activity of a construct (–21/+92) in which the GC-rich region was also deleted was even less than that of the –58 construct in all tested cell lines (data not shown).

Taken together, the analysis of the E-cadherin promoter indicated that the cell-type specificity in cultured keratinocytes was controlled by positive elements (the GC-rich and CCAAT regions) and repressor elements (the E-pal sequence). Interestingly, the repressor activity was strong in undifferentiated spindle CarB cells.

Binding of Nuclear Factors to the E- and P-Cadherin Promoters

To begin to study the specific sequences and nuclear factors involved in the recognition of the proximal P- and E-cadherin promoters, we performed DNase I footprinting assays. Analysis with nt –200 to +120 of the P-cadherin promoter showed that nuclear extracts from CarB, HaCa4, and PDV cells protected only a wide region from nt –98 to –60 (Figure 3A). Similar results were obtained when the coding strand was used as a labeled probe and with MCA3D nuclear extracts (data not shown). The protected area clearly covered the CCAAT box (nt –64 to –60) and part of the GC-rich region, including the complete Sp1 binding site (nt –88 to –80) and the 3' half of the AP2 binding site (nt –98 to –95). On the other hand, no protection was observed at any other region in nt –200 to +120, including the distal 5' upstream sequences, the transcription start region, and the 3' AP2 site at nt +30. Incubation of the probe with purified Sp1 factor gave rise to a narrower protection pattern (nt –98 to –74) (Figure 3A, lane Sp1), indicating the participation of a Sp1-related factor in the recognition of that region and the presence in the nuclear extracts of additional factors able to bind to the nt –73 to –60 protected region. Evidence for involvement of a Sp1-related factor in the recognition of the nt –94 to –74 region was obtained by competition experiments with an oligonucleotide containing a consensus Sp1 binding site from the SV40 promoter. This oligonucleotide was able to totally compete the protection of the nt –98 to –74 region generated by purified Sp1 factor or PDV nuclear extract but only partially compete the nt –73 to –60 region protected by PDV nuclear factors (Figure 3B, + lanes). In contrast, no protection of nt –98 to –60 was observed with purified AP2 factor; nor were consensus AP2 oligonucleotides able to compete the protected region (data not shown). These results strongly suggested that a Sp1-related

factor is involved in the recognition of the nt -94 to -74 GC-rich region of the P-cadherin promoter. The same protected pattern was observed in expressing (PDV, HaCa4, and MCA3D) and non-expressing (CarB) keratinocyte cell lines.

Footprinting analysis of the proximal E-cadherin promoter (nt -178 to +17) was also performed with nuclear extracts from E-cadherin-positive (MCA3D) and -negative (HaCa4 and CarB) cell lines (Figure 3C). Three protected regions were detected in expressing MCA3D cells: (a) the proximal GC-rich and CCAAT regions, (b) the 3' end of the E-pal element, and (c) the 5' end of the E-pal and additional 5' upstream sequences, including a second GC-rich region. A hypersensitive site in the center of the E-pal element was also detected in MCA3D extracts. A similar protection pattern was detected in other E-cadherin-positive cells, like PDV (data not shown). In contrast, the protection pattern obtained with nuclear extracts from HaCa4 and CarB cells showed a weaker or almost complete lack of protection of the proximal GC-rich/CCAAT region (a) and of the 5' distal sequences (c). In addition, there was weaker protection of the 3' end of the E-pal element and absence of the hypersensitive site in both HaCa4 and CarB extracts. These results suggested that loss or modification of some of the nuclear factors involved in the recognition of the proximal E-cadherin promoter occurred in non-expressing keratinocytes.

The binding sites, included in the CCAAT box and GC-rich region of both the E- and P-cadherin promoters, were further analyzed by gel retardation assays using nuclear extracts from the different cell lines. To study the factors recognizing the CCAAT box element in both promoters, gel retardation assays were performed with labeled CCAAT oligonucleotides from the E- and P-cadherin promoters. As shown in Figure 4A, when PDV nuclear extracts were used, three specific retarded complexes were obtained with the E-cadherin CCAAT probe (CCAAT.E), whereas only one specific retarded complex (exhibiting the same apparent mobility as but a stronger intensity than that of the slower-migrating complex

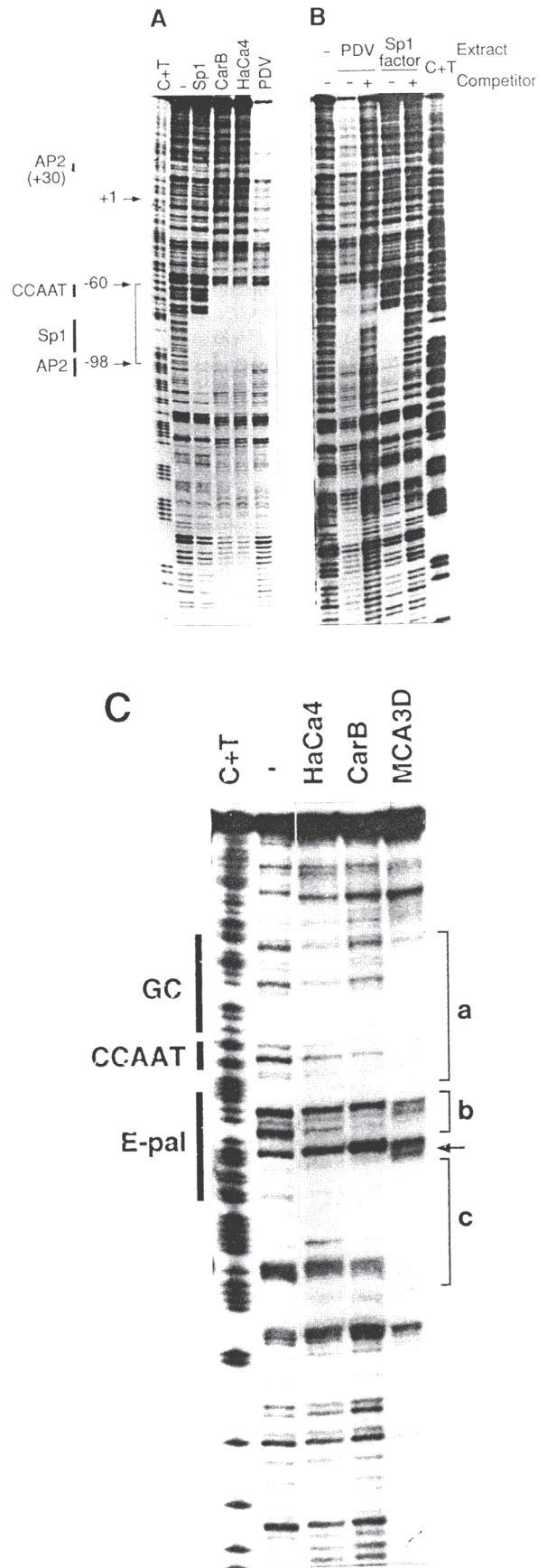


Figure 3. DNase I footprinting analysis of the 5' proximal P- and E-cadherin promoters. (A and B) Analysis of the P-cadherin promoter. The nt -200 to +120 fragment of P-cadherin 3' end labeled with 32 P on the noncoding strand was incubated in the absence (-) or presence of Sp1 purified transcription factor (1 foot printing unit) and 4 ng of DNase I or nuclear extracts of the indicated cell lines (CarB, 43.5 μ g; HaCa4, 47 μ g; PDV, 10.5 μ g) and 40 ng of DNase I. Panel B shows footprinting protection of the P-cadherin promoter with PDV nuclear extracts or Sp1 purified factor in the absence (-) or presence (+) of 50 ng of an oligonucleotide containing the Sp1 binding site of the SV40 promoter. (C) Analysis of the E-cadherin promoter. The nt -178 to +17 fragment of E-cadherin 3' end labeled with 32 P on the noncoding strand was incubated in the absence (-) or presence of nuclear extracts of the indicated cell lines (HaCa4, 47 μ g; CarB, 53 μ g; MCA3D, 60 μ g) and 40 ng of DNase I. The main areas protected by the nuclear extracts (brackets), the sequence binding sites for the different factors (thick bars) and the transcription start site (nt +1), are indicated. C + T, products of Maxam-Gilbert sequencing reactions to the probes.

detected with the CCAAT.E probe) was obtained with the P-cadherin CCAAT probe (CCAAT.P). An excess of cold CCAAT.P oligonucleotide competed exclusively the slower-migrating complex of CCAAT.E, without affecting the other two complexes. Conversely, an excess of cold CCAAT.E oligonucleotide partially competed the specific retarded complex detected with the CCAAT.P probe. Oligonucleotides containing consensus binding sites for the CCAAT-binding factor CP1 [40] partially competed the complex obtained with the CCAAT.P probe and competed effectively the three complexes generated by the CCAAT.E probe, which were also partially competed by oligonucleotides containing consensus binding sites for the CCAAT-binding factor CP2. On the other hand, oligonucleotides containing consensus binding sites for C/EBP factor [41] effectively competed the two faster-migrating complexes generated by the CCAAT.E probe without affecting the slower one or the complex obtained with the CCAAT.P probe. No competition of the complexes obtained with either probe was detected when oligonucleotides containing consensus binding sites for NF1 factor [42] were used. Identical results were obtained when nuclear extracts from HaCa4 and CarB cells were analyzed (data not shown). These results indicate that common nuclear factors, probably related to the CP1 family, participated in the recognition of the CCAAT box of both E- and P-cadherin promoters and that additional specific factors related to the CP2 and CAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) families were also involved in the CCAAT-box interaction of the E-cadherin promoter in murine keratinocytes.

We also analyzed the proximal GC-rich regions of both promoters by band-shift assays using the corresponding GC-rich oligonucleotides as labeled probes. The results obtained with PDV nuclear extracts are shown in Figure 4B. The proximal GC-rich region from the E-cadherin promoter (GC.E) gave rise to three specific retarded complexes: two (complexes 1 and 2) with the same apparent mobility of those obtained with the GC-rich region of the P-cadherin promoter (GC.P) and an additional complex of intermediate mobility (complex 3). The two complexes obtained with the GC.P probe, which exhibited a stronger intensity than those obtained with the GC.E probe, were effectively competed with an excess of cold GC.P and GC.E oligonucleotides. In contrast, an excess of cold GC.P oligonucleotide, although competing efficiently the complexes 1 and 2, was unable to compete the specific mobility complex 3 generated by the GC.E probe. The two complexes of GC.P probe were also competed with oligonucleotides containing the Sp1 binding site from the P-cadherin promoter (SP1.P) and consensus Sp1 oligonucleotides from the SV40 promoter (SP1.SV40) but were only weakly competed by oligonucleotides containing AP2 binding sites from the P-cadherin (AP2.P) or SV40 (AP2.SV40) promoters. On the other

hand, the three complexes generated with the GC.E probe were competed by oligonucleotides containing consensus AP2 binding sites from the SV40 promoter (AP2.SV40), but only weak competition of the GC.E complexes was detected with oligonucleotides containing the AP2 binding site from the GC-rich region of the P-cadherin promoter (AP2.P). In addition, the complexes 1 and 2 obtained with the GC.E probe were competed with oligonucleotides containing consensus Sp1 binding sites from the SV40 promoter (SP1.SV40) and from the GC-rich region of the P-cadherin promoter (SP1.P), but both types of Sp1 oligonucleotides were unable to compete complex 3.

Band-shift analysis of the GC-rich region of both promoters was also performed with nuclear extracts from HaCa4 cells (E-cadherin-/P-cadherin+) and CarB (E-cadherin-/P-cadherin-), with the same competitors as for PDV extracts. The results, presented in Figure 5, showed that the retardation patterns of the E- and P-cadherin GC-rich regions obtained with both nuclear extracts were the same as for PDV cells. The full set of competitions performed with HaCa4 extracts is presented in Figure 5A. As can be observed, competition of the two retarded complexes of the P-cadherin region was the same as that obtained with PDV extracts: competition by SP1.P and SP1.SV40 oligonucleotides and no competition with AP2.P and consensus AP2.SV40 oligonucleotides. However, competition of the three retarded complexes of the E-cadherin region was somewhat different than the results obtained with PDV extracts, as no competition of complexes 1 and 2 of the GC.E region was detected with AP2.P or consensus AP2.SV40 oligonucleotides (compare Figure 5A with 4B), although these two complexes were effectively competed by GC.P, SP1.P, and SP1.SV40 oligonucleotides. The competition patterns obtained with CarB extracts with both E- and P-cadherin regions were similar to those obtained with HaCa4 extracts (Figure 5B and data not shown).

The involvement of Sp1 factor in the complexes of the GC-rich regions of both promoters was confirmed by supershift analysis. As can be observed in Figure 6, anti-Sp1 antibodies supershifted the complexes generated by the GC-rich regions of both promoters in nuclear extracts from PDV, HaCa4, and CarB cells. In all cases, the supershifted band was associated with a decrease in the faster-mobility complex of the GC-rich regions of both promoters. Anti-AP2 antibody did not supershift any of the complexes obtained with the GC-rich region of the P-cadherin promoter; however, it induced a decrease in the specific E-cadherin complex 3 (in PDV and CarB extracts) and the appearance of a supershifted band (in HaCa4 extracts).

These results indicated that the GC-rich region of the P-cadherin promoter was mainly recognized by Sp1-related nuclear factors, whereas the corresponding region of the E-cadherin promoter exhibited a

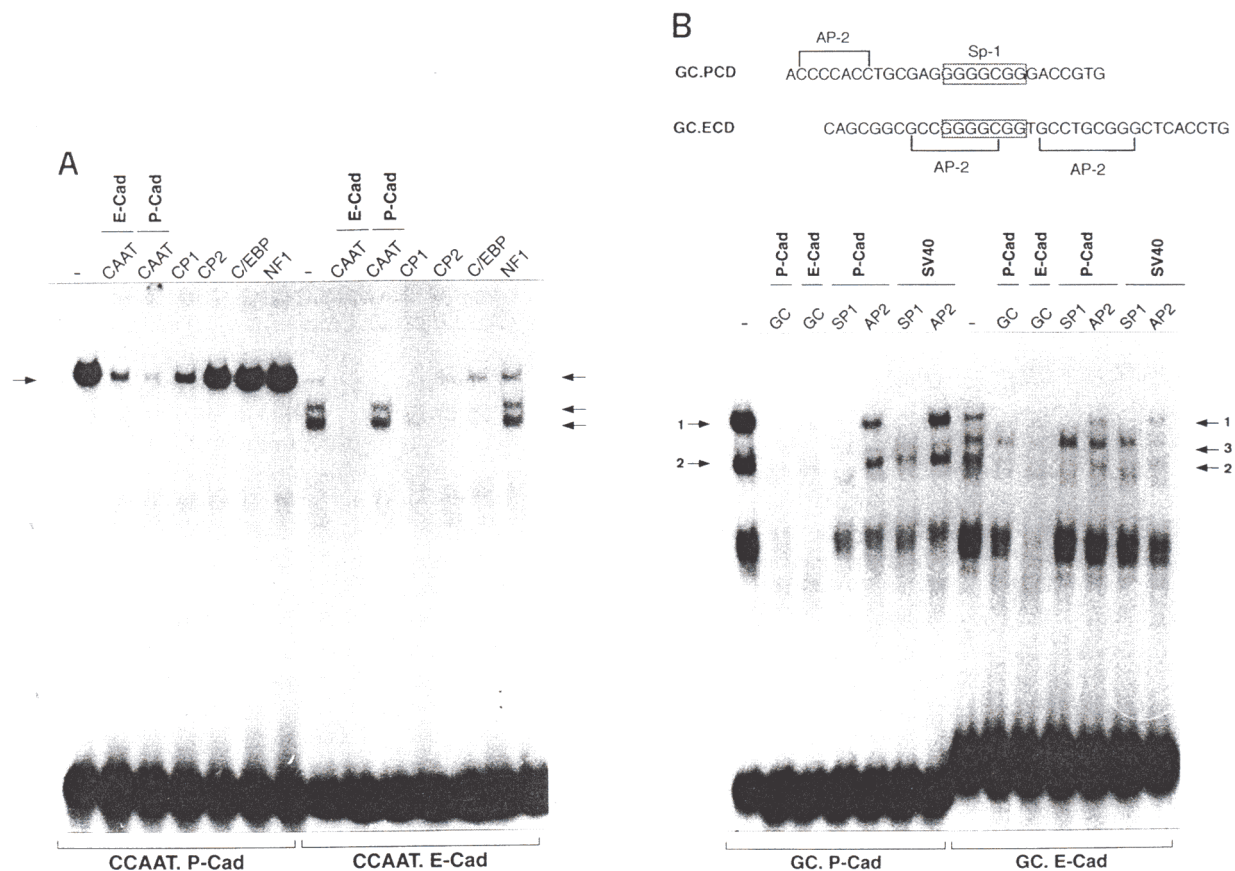


Figure 4. Band-shift analysis of the CCAAT box and GC-rich regions of E- and P-cadherin promoters with PDV extracts. Gel retardation assays were performed with 4 μ g of PDV nuclear extracts, as indicated in Material and Methods. (A) Labeled oligonucleotides containing the CCAAT box from the E-cadherin (CCAAT.E) and P-cadherin (CCAAT.P) promoters used as probes. Cold oligonucleotides containing consensus sites for different CCAAT binding factors (CP1, CP2, C/EBP, and NF1) or cold E- and P-cadherin CCAAT oligonucleotides were used as competitors with a hundredfold molar excess of the labeled probes. (-), no competitor added. The main retarded complexes are indicated by arrows. (B) The sequences containing the GC-rich region from the E-cadherin (GC.ECD) or P-cadherin (GC.PCD)

promoters, indicated at the top, were used as labeled probes in the absence (-) or presence of a hundredfold molar excess of cold oligonucleotides. The competitor oligonucleotides used were cold GC.E and GC.P oligonucleotides and oligonucleotides containing Sp1 or AP2 binding sites from the P-cadherin promoter or the SV40 promoter, as indicated above the lanes. The main retarded complexes observed with the GC.E probe are indicated by arrows on the right (complexes 1, 2, and 3), and those obtained with the GC.P probe are indicated on the left (complexes 1 and 2). The positions of potential Sp1- and AP2-binding sites in the GC.PCD and GC.ECD regions are shown at the top of the panel.

more complex pattern, with the involvement of Sp1-related factors and the additional participation of AP2-related factors in murine keratinocytes. The results also support the existence of differential modifications (or specific isoforms) of those factors in E-cadherin -expressing and -non-expressing keratinocytes.

On the other hand, band-shift analysis of the E-pal region of E-cadherin showed the presence of one specific retarded complex in both expressing and non-expressing keratinocytes (data not shown), similar to previous observations in other cell systems [22,25]. Finally, there was no evidence for direct involvement of the second AP2 site of the P-cadherin promoter located downstream of the transcription start site, as no specific retarded complexes were detected when a labeled oligonucleotide containing the AP2 binding sequence at nt +30 was incubated with nuclear extracts from any cell line.

Influence of the GC-Rich and E-Pal Regions of E-Cadherin Promoter in the Activity of the P-Cadherin Promoter in Epidermal Keratinocytes

The similarities and differences detected in the sequence analysis and in the band-shift assays of the GC-rich regions of the E- and P-cadherin promoters raised the question of whether the regions were interchangeable. Therefore, we designed a hybrid promoter construction in which the GC-rich region of the P-cadherin promoter was replaced by that of the E-cadherin promoter by inserting the GC.E region (nt -60 to -23) 5' of the -75 P-cadherin construct, which had the endogenous GC-rich region deleted. The activity of this construct was tested in the different keratinocyte cell lines in parallel with the -200 and -75 P-cadherin constructs. As shown in Table 3, the GC.E-rich region moderately increased the ac-

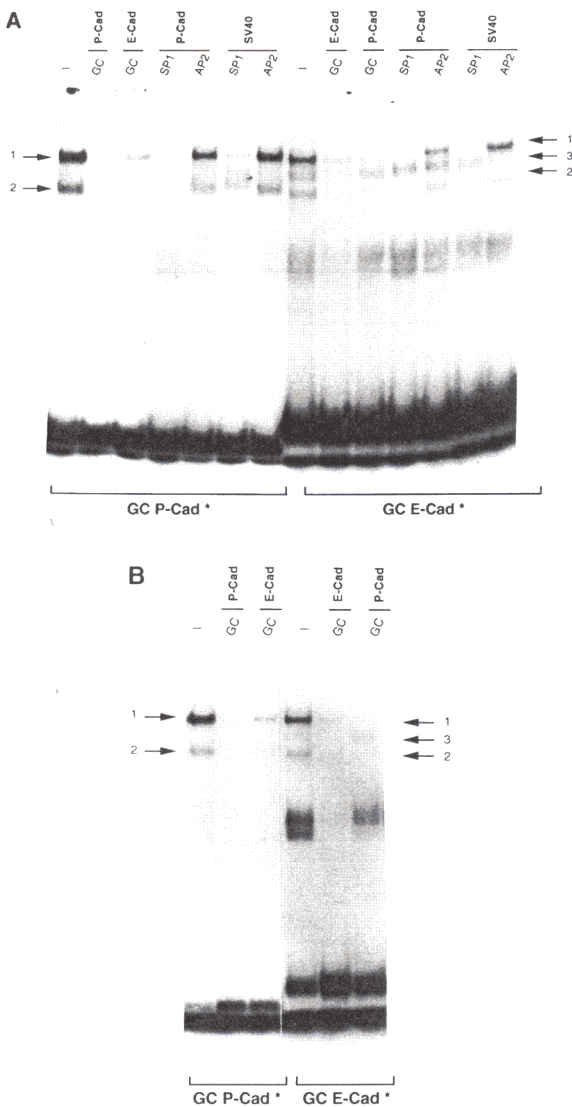


Figure 5. Band-shift analysis of the GC-rich regions of E- and P-cadherin promoters with HaCa4 and CarB extracts. Gel retardation assays and competition with the indicated oligonucleotides were performed with 2.5 μ g of HaCa4 (A) and CarB (B) nuclear extracts as described in Figure 4B. The main retarded complexes observed with the GC.E probe are indicated by arrows on the right (complexes 1, 2, and 3), and those obtained with the GC.P probe are indicated on the left (complexes 1 and 2).

tivity of the -75 P-cadherin promoter in the different cell lines (about twofold to fourfold) giving rise to luciferase values close to those of the -200 construct in the different cell lines (50–80% activity). These results indicated that the GC-rich region of E-cadherin promoter was partially able to substitute for the homologous GC-rich region of the P-cadherin promoter.

The possible influence of the E-pal element of E-cadherin promoter on the activity of the heterologous P-cadherin promoter in murine keratinocytes was also analyzed by using a hybrid construct in which the E-pal element was inserted 5' of the -200

P-cadherin promoter. A moderate inhibitory effect (40% inhibition) was observed in the activity of the -200 promoter in HaCa4 cells, whereas a much weaker effect or no significant effect was observed in the other three cell lines (data not shown).

DISCUSSION

The correct expression of functional cadherins is a crucial process in animal morphogenesis that needs precise spatio-temporal regulation. Alterations in cadherin expression occur in neoplastic processes and lead to the loss of cell-cell interactions, thus constituting an important mechanism of tumor progression and invasiveness [reviewed in 2]. To understand the molecular mechanisms involved in down-regulation of E- and P-cadherin expression in mouse skin carcinogenesis, we analyzed the promoter activities of both genes in a collection of murine keratinocytes representing different stages of mouse skin tumor progression. Several regulatory elements present in the 5' promoter of the mouse and human E-cadherin gene were previously described and analyzed in other cell systems, and the results support a major positive role for a proximal GC-rich region and a CCAAT box and a repressor role for the palindromic E-pal element [22,23,25]. The regulatory elements of the P-cadherin promoter are still not well defined [28]. Based on sequence analysis, we previously postulated the existence of potential regulatory elements in the 5' proximal region of the mouse P-cadherin promoter [29]. The transient transfection analysis reported here with different constructions of the 5' upstream region of the P-cadherin promoter showed that positive elements leading P-cadherin transcription in expressing keratinocytes were concentrated in the nt -200 to +47 proximal region and suggested a regulatory role for the GC-rich (nt -101 to -80) and the CCAAT box (nt -65). Interestingly, the -200 P-cadherin promoter exhibited cell-type specificity and was basically inactive in non-expressing spindle cells. The role of the GC-rich and CCAAT regions in the transcriptional regulation of P-cadherin expression was further supported by the DNase I footprinting analysis of the nt -200 to +120 region, where binding of nuclear factors was exclusively detected between nt -94 and -60, which includes most of the GC-rich region and the CCAAT box (Figure 3A and B). Specific retarded complexes were also detected with both regions in band-shift assays of nuclear extracts from expressing and non-expressing cells. Direct involvement of Sp1 factors in the recognition of the GC-rich region was established by supershift analysis (Figure 6). The nature of the factors binding to the P-cadherin CCAAT box remains unclear. Although the results of the gel retardation assays suggest the involvement of a CP1-related factor (Figure 4), an oligonucleotide containing a CP1 binding site could not prevent the CCAAT box protection detected in the footprinting

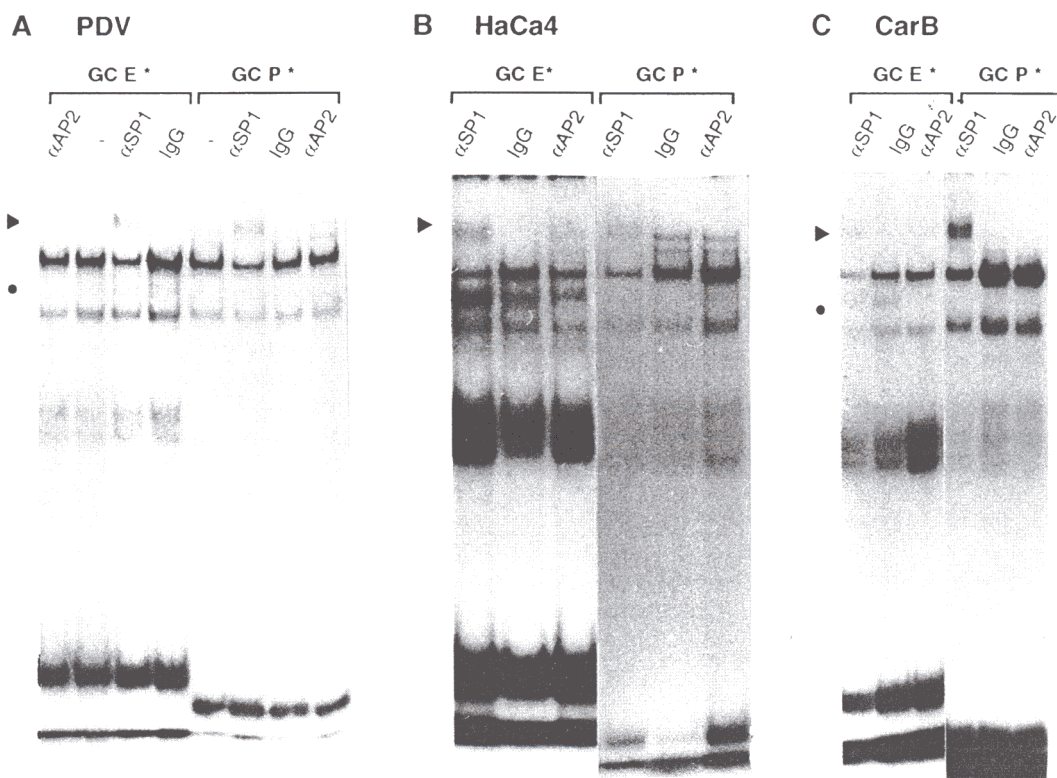


Figure 6. Supershift analysis of the GC-rich complexes of E- and P-cadherin promoters with nuclear extracts from PDV (A), HaCa4 (B), and CarB (C) cells. Gel retardation assays were performed with the GC.P and GC.E labeled probes in the absence (–) or presence of anti-Sp1 antibody, anti-AP2 antibody, or purified rabbit immunoglobulin G (1 μ g/reaction) with nuclear

extracts of the indicated cell lines. Supershifted complexes detected with anti-Sp1 and anti-AP2 antibodies are indicated by arrowheads, and the decreased complex 3 of the GC.E probe detected with anti-AP2 antibodies is indicated by a dot. The retarded complexes obtained in the absence and presence of immunoglobulin G in HaCa4 and CarB extracts were exactly the same.

analysis (data not shown). These partially discrepant results could be due to stabilization of the binding of CP1 (or a related factor) with the CCAAT box by protein-protein interactions with the adjacent Sp1 factor, as has been previously described for C/EBP-SP1 interactions in the rat cytochrome P450D5 promoter [44]. In this context, it is interesting to note that the SP1.SV40 consensus oligonucleotide partially prevented the protection of the P-cadherin CCAAT box region in the footprinting reaction with PDV nuclear extracts (Figure 3B), suggesting that Sp1 factors could mediate the interaction of the CCAAT box with its cognate nuclear factor or factors. On the other hand, although the transient transfection assays with the Δ AP2 construct suggested that nt +14 to +47 is required for the optimal activity of the P-cadherin promoter (Figure 1B), direct interaction of the putative 3' AP2 binding site (nt +30) with nuclear factors was not detected either in the footprinting analysis (Figure 3) or in gel retardation assays (data not shown). Alternatively, the decreased activity of the Δ AP2 construct can be explained by reduced stability or translational activity of the mRNA because of the deleted 5' noncoding leader region (nt +14 to +47), as has been suggested for other cases such as

the α - and β -globin [45] and yeast CAT mRNAs [46]. This possibility will be tested in future studies.

In the non-expressing spindle CarB cells, the different P-cadherin promoter constructs had signifi-

Table 3. Effect of the GC-Rich Region of the E-Cadherin Promoter on the Basal Activity of the P-Cadherin Promoter

Cell line	Activity of promoter constructs (% CMV-Luc)*			
	–200	–75	GC.E/–75	Fold-increase†
MCA3D	1.75	0.35	0.83	2.37
PDV	5.9	2.0	3.7	1.85
HaCa4	1.9	0.22	0.8	3.63
CarB	0.63	0.13	0.5	3.84

*The P-cadherin promoter constructs –200 and –75 are shown in Figure 1A. Construct GC.E/–75 was generated by inserting the GC-rich region of the E-cadherin promoter (nt –60 to –23) 5' of the –75 construct as indicated in Materials and Methods. The activity of the constructs in the various cell lines was estimated as described in Materials and Methods and is given as the percentage of the activity driven by the CMV-Luc promoter. The data are averages obtained from two independent experiments, performed in duplicate.

†The fold-increase was derived from the ratio of the activities of the GC.E/–75 and the –75 constructs.

cantly less activity than in the expressing keratinocyte cell lines. This low activity of the exogenous promoter could not be explained, however, by the results of binding studies of nuclear factors in the CCAAT box and GC-rich region, because similar results were obtained with PDV, HaCa4, and CarB nuclear extracts. Specifically, Sp1 factors seem to participate in the recognition of the GC-rich region in expressing and non-expressing cells. One possible explanation for the lack of activity of the exogenous P-cadherin promoter in CarB cells is the existence of different isoforms or differential modification of Sp1 factors or lack of interaction with specific coactivators rendering them inactive in CarB cells. This observation is also in line with a report on the regulation of keratin K18 gene expression in colon carcinoma cells, in which the binding of Sp1 factor differentially modulates the activity of the 5' proximal promoter in two cell clones differing in the level of K18 expression by fivefold to sixfold [47].

The analysis of the E-cadherin promoter showed that the nt -178 to +92 construct exhibited cell-type specificity in the keratinocyte cell system (Figure 2 and Table 2), with positive involvement of the CCAAT box and GC-rich proximal region and a repressor role for the E-pal element, in agreement with previous observations in other cell systems [22,25]. The strongest repressor effect of the E-pal element, observed in spindle CarB cells devoid of promoter activity, strongly supports a dominant role for this negative regulator in undifferentiated cells. Interestingly, the footprinting analysis of the E-cadherin promoter detected distinct protection of the E-pal element and adjacent 5' sequences in expressing and non-expressing keratinocytes (Figure 3C), supporting the existence of modifications in the factor or factors that recognize those sequences or in their interaction with coactivators between both cell types.

Comparison of the nuclear factors interacting with the CCAAT box and GC-rich region of the E- and P-cadherin promoters showed that although common nuclear factors appeared to participate in both promoters (CP1- and Sp1-related factors for the CCAAT box and GC regions, respectively), additional factors were involved in the recognition of both elements of the E-cadherin-promoter, giving rise to E-cadherin-specific nuclear complexes. CP2- and C/EBP-related nuclear factors seem to be responsible for the specific CCAAT complexes of the E-cadherin promoter, whereas AP2-related factors are mainly involved in the specific GC complexes of E-cadherin, as in other cell types [25]. Interestingly, the weaker protection of the proximal GC-rich region and the results of the band-shift assays support some kind of modification in the Sp1 or AP2 factors or their coactivators in E-cadherin-deficient HaCa4 and CarB cells. These alterations, together with the repressor

effect of the E-pal element, could account for the low level or lack of activity of the E-cadherin promoter in those cell lines.

Taken together, the results obtained in this study suggest that the two promoters are regulated by different mechanisms with regard to the involved transcription factors, although the promoters appear very similar in their sequence composition (i.e., both lack TATA boxes and contain GC-rich regions and CCAAT boxes). As seen with other epithelial promoters, a significant degree of specificity seems to be derived from different combinations of general transcription factors rather than from the action of epithelium-specific factors [48-51]. This differential regulation of the two promoters in cultured keratinocytes can be related to the differential pattern of expression of both genes in the epidermis, P-cadherin being restricted to the basal proliferative layer and E-cadherin expressed in basal and suprabasal layers [7,11]. Our results also support the involvement of the E-pal element of E-cadherin promoter as an important repressor in non-expressing undifferentiated keratinocytes. On the other hand, modification or loss of some of the factors interacting with the regulatory regions of both promoters (such as in the Sp1- and AP2-related and E-pal-recognizing factors) seemed to occur in non-expressing malignant keratinocytes, which may therefore play a role in the down-regulation of E- and P-cadherin in mouse skin carcinogenesis. Further studies will be needed to clarify the interactions among the different factors and to definitively characterize the complex pattern of modulation of E- and P-cadherin gene expression. Nevertheless, our results contribute to the limited knowledge on the regulation of cadherin gene expression in normal epidermis and in skin carcinogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Amalia Montes for her excellent technical assistance, Antonio Fernández and Ricardo Uña for the photography, and Dr. Miguel Quintanilla for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants SAF92-0146 and SAF-0818 from the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and CAM (AE00022/94) to AC. IR is a recipient of a predoctoral fellowship from the Comunidad Autónoma de Madrid. During the realization of this work, MLMF was a recipient of a postdoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Sciences and the Scientific Foundation of the Spanish Cancer Research Association.

REFERENCES

1. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455, 1991.
2. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: Role in the formation of cell junctions and the prevention of invasive-ness. *Biochim Biophys Acta* 1198:11-26, 1994.

3. Kemler R. Classical cadherins. *Semin Cell Biol* 3:149–155, 1992.
4. Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonic carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21:927–934, 1980.
5. Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, et al. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca^{2+} -dependent cell adhesion. *EMBO J* 6:3647–3653, 1987.
6. Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 101:19–27, 1984.
7. Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: Its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 103:2649–2658, 1986.
8. Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Cloning and expression of cDNA-encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: Its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* 106:873–881, 1988.
9. Gallin WJ, Edelman GM, Cunningham BA. Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1038–1042, 1983.
10. Takeichi M. The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639–655, 1988.
11. Fujita M, Furukawa F, Fujii K, Horiguchi Y, Takeichi M, Imamura S. Expression of cadherin cell adhesion molecules during human skin development: Morphogenesis of epidermis, hair follicles and eccrine sweat ducts. *Arch Dermatol Res* 284:159–166, 1992.
12. Takeichi M. Cadherins in cancer: Implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5:806–811, 1993.
13. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, et al. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49:2128–2133, 1989.
14. Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 51:2185–2192, 1991.
15. Navarro P, Gómez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* 115:517–533, 1991.
16. Ruggeri B, Caamano J, Slaga TJ, Conti CJ, Nelson WJ, Klein-Szanto AJ. Alterations in the expression of uvomorulin and Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase during mouse skin tumor progression. *Am J Pathol* 140:1179–1185, 1992.
17. Cano A, Gamallo C, Kemp CJ, et al. Expression pattern of the cell adhesion molecules E-cadherin, P-cadherin and $\alpha 6 \beta 4$ integrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient mice. *Int J Cancer* 65:254–262, 1996.
18. Ringwald M, Baribault H, Schmidt C, Kemler R. The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Nucleic Acids Res* 19:6533–6539, 1991.
19. Hatta M, Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M. Genomic organization and chromosomal mapping of the mouse P-cadherin gene. *Nucleic Acids Res* 19:4437–4441, 1991.
20. Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse N-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8443–8447, 1992.
21. Sorkin BC, Hemperley JJ, Edelman GM, Cunningham BA. Structure of the gene for the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7617–7621, 1988.
22. Behrens J, Löwrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W. The E-cadherin promoter: Functional analysis of the GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11495–11499, 1991.
23. Bussemakers MJ, Girolodi LA, van Bokhoven A, Schalken JA. Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cell lines: Characterization of the human E-cadherin promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1284–1290, 1994.
24. Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E, Birchmeier W. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter *in vivo*. *Oncogene* 11:475–484, 1995.
25. Hennig G, Löwrick O, Birchmeier W, Behrens J. Mechanism identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem* 271:595–602, 1996.
26. Sorkin BC, Jones FS, Cunningham BA, Edelman GM. Identification of the promoter and a transcriptional enhancer of the gene encoding L-CAM, a calcium-dependent cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11356–11360, 1993.
27. Goomer RS, Holst BD, Wood IC, Jones FS, Edelman GM. Regulation *in vitro* of an L-CAM enhancer by homeobox genes HoxD9 and HNF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7985–7989, 1994.
28. Hatta M, Takeichi M. Complex cell type-specific transcriptional regulation by the promoter and an intron of the mouse P-cadherin gene. *Development Growth & Differentiation* 36:509–519, 1994.
29. Faraldo MLM, Cano A. The 5' flanking sequences of the mouse P-cadherin gene. Homologies to 5' sequences of the E-cadherin gene and identification of a first 215 base-pair intron. *J Mol Biol* 231:935–941, 1993.
30. Díaz-Guerra M, Haddow S, Bauluz C, et al. Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harbouring Harvey ras gene alterations. *Cancer Res* 52:680–687, 1992.
31. Nordeen SK. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6:454–457, 1988.
32. Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I, Howard BH. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6777–6781, 1982.
33. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsh-Häslar K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521–530, 1985.
34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
35. Gorman CM, Moffat LF, Howard BH. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2:1044–1051, 1982.
36. Shapiro DJ, Sharp PA, Wahli WW, Keller MJ. A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA* 7:47–55, 1988.
37. Hennighausen L, Lubon H. Interaction of protein with DNA *in vitro*. *Methods Enzymol* 152:721–735, 1987.
38. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51:1079–1090, 1987.
39. Imagawa M, Chiu R, Karin M. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: Protein kinase C and cAMP. *Cell* 51:251–260, 1987.
40. Chodosh LA, Baldwin AS, Carthew RW, Sharp PA. Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 53:11–24, 1988.
41. Ryden TA, Beemon K. Avian retrovirus long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol Cell Biol* 9:1155–1164, 1989.
42. Courtis SJ, Lafontaine DA, Lemaigre FP, Durvieux SM, Rousseau GG. Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res* 18:57–64, 1990.
43. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6:2363–2369, 1991.
44. Lee YH, Yano M, Liu SY, Matsunaga E, Johnson PF, González FJ. A novel cis-acting element controlling the rat CYP2D5 gene and requiring cooperativity between C/EBP β and an Sp1 factor. *Mol Cell Biol* 14:1383–1394, 1994.
45. Kozak M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit α and β -globin mRNAs that affect translational efficiency. *J Mol Biol* 235:95–111, 1994.
46. Sagliocco FA, Vega-Laso MR, Zhu D, Tuite MF, McCarthy JEG, Brown AJP. The influence of 5'-secondary structures upon ribosome binding to mRNA during translation in yeast. *J Biol Chem* 268:26522–26530, 1993.
47. Gunther M, Frebourg T, Laithier M, et al. An Sp1 binding site and the minimal promoter contribute to overexpression of the cytokeratin 18 gene in tumorigenic clones relative to that in nontumorigenic clones of a human carcinoma cell line. *Mol Cell Biol* 15:2490–2499, 1995.
48. Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol* 76:4455–4463, 1993.

49. Apt D, Liu Y, Bernard HU. Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: Interference with transcriptional activation by NF1/CTF in a cell-type specific manner. *Nucleic Acids Res* 22:3825–3833, 1994.
50. Bernard HU, Apt D. Transcriptional control and cell type specificity of HPV gene expression. *Arch Dermatol* 130:210–215, 1994.
51. Hoppe-Seyler F, Butz K. Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. *Mol Carcinog* 10:134–141, 1994.